

SÉRIE A,
N° 4524
N° D'ORDRE
5371

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Alain BAUDRAS

1^{re} THÈSE : Étude des propriétés et du rôle catalytique des groupes prosthétiques flavinique et cytochromique de la L-Lacticodéshydrogénase de la levure.

2^e THÈSE : Propositions données par la Faculté : Application de la résonance paramagnétique électronique à l'étude des semi-quinones dans les flavoenzymes.

Soutenues le 10 juin 1965 devant la Commission d'examen.

M. TONNELAT *Président.*
M. SLONIMSKI } *Examineurs.*
M^{me} LABEYRIE }

LONS - LE - SAUNIER
IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1966

SÉRIE A,
N° 4524

N° D'ORDRE
5371

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Alain BAUDRAS

1^{re} THÈSE : Étude des propriétés et du rôle catalytique des groupes prosthétiques flavinique et cytochromique de la L-Lactico-déshydrogénase de la levure.

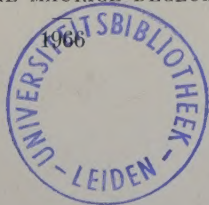
2^e THÈSE : Propositions données par la Faculté : Application de la résonance paramagnétique électronique à l'étude des semi-quinones dans les flavoenzymes.

Soutenues le 10 juin 1965 devant la Commission d'examen.

M. TONNELAT *Président.*

M. SLONIMSKI
M^{me} LABEYRIE } *Examineurs.*

LONS - LE - SAUNIER
IMPRIMERIE MAURICE DECLUME



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen M. ZAMANSKY.

BRELOT	T Analyse supérieure.	CUVILLIER	T Micropaléontologie.
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparées.	JUNG	T Géologie.
GRASSÉ	T Evolution des êtres organisés.	TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique.
PRÉVOST	T Chimie organique.	WIEMANN	T Chimie organique structurale.
WYART	T Minéralogie et Cristallographie.	JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste (Orsay).
TEISSIER	T Zoologie.	VASSY	T Physique de l'atmosphère
MANGENOT	T Biologie végétale (Orsay).	DESTOUCHES	T Théories physiques.
AUGER	T Physique quantique et relativité.	AMIEL	T Chimie génér.
MONNIER	T Physiologie générale.	HOCART	T Minéralogie et Cristallographie.
PIVETEAU	T Paléontologie.	J.-P. MATHIEU	T Physique Optique.
ROCARD	T Physique E.N.S.	COUTEAUX	T Cytologie.
CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.).	MAY	T Zoologie
LAFFITTE	T Chimie générale.	CHOQUET	T Théor. des fonct. et topologie.
N.	T Géométrie supérieure.	FELDMANN	T Biologie végétale marine.
COULOMB	T Physique du globe.	GUINIER	T Physique des solides (Orsay).
Mlle COUSIN	T Biologie anim. S.P.C.N.	JOST	T Physique comparée.
CHRÉTIEN	T Chimie minérale.	FORTET	T Calcul des probabilités et Phys. math.
BCCQUET	T Zoologie.	SCHWARTZ	T Calcul différentiel et intégral.
KASTLER	T Physique E.N.S.	CHOUARD	T Physiologie Végétale.
ÉPHRUSSI	T Génétique.	MALAVARD	T Aviation (Tech. aéronaut)
RIVIÈRE	T Géologie S.P.C.N. et sédim. (Orsay).	NORMANT	T Synthèse organique.
GAUTHERET	T Biologie végét. P.C.B.	BENARD	T Chimie minérale.
LUCAS R.	T Recherches physiques.	BUVAT	T Botanique E.N.S.
THOMAS A.	T Biologie cellulaire.	DUGUE	T Statistiques Math.
ARNULF	T Optique appliquée.	SOULAIRAC	T Psychophysiologie.
MORAND	T Physique Enseignement.	ULRICH	T Physiol. végétale appl.
SOLEILLET	T Physique. P.C.B.	MARÉCHAL	T Optique théorique et appl.
FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides.	KIRRMANN	T Théories chimiques.
DRACH	T Zoologie.	CHADEFAUD	T Botanique.
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique.	Mlle LE BRETON	T Physiologie de la nutrition.
GALLIEN	T Embryologie	LELONG	T Application de l'analyse à la géométrie.
EICHHORN	T Botanique.	DEVILLERS	T Anatomie et Histologie comparées.
DE CUGNAC	T Biologie végét. S.P.C.N.	EHRESMANN	T Topologie algébrique
Mlle CAUCHOIS	T Chimie-Physique.	FRANÇON	T Physique S.P.C.N.
THELLIER	T Physique du Globe.	GLANGEAUD	T Géographie physique et Géologie.
L'HÉRITIER	T Biologie générale (Orsay).	DODEMENT	T Mathématiques M.G.P.
GRIVET	T Radioélectricité (Orsay).	PISOT	T Technique mathématique de la physique.
PONCIN	T Mécanique générale.	ROCH	T Géologie.
DU BREIL	T Arithmétique et théorie des nombres.		
QUELET	T Chimie organique.		
CAGNIARD	T Géophysique appliquée.		
CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire.		

SCHATZMANN	T Astrophysique.	ALLARD	T Chimie physique.
TERMIER	T Géologie générale.	BERTHELOT	T Phys. des particules fon-
ZAMANSKY	T Mathématiques générales.		damentales (Orsay).
LENNUIER	T Physique M.G.P.	BRICARD	T Météorologie et physique
RIZET	T Génétique (Orsay).		de l'atmosphère.
ROUTHIER	T Géologie appliquée.	Mme ALBE-	
Mme TONNELAT	T Physique théorique.	FESSARD	T Psycho-physiologie.
DIXMIER	T Mathématiques M.P.C	FRIEDEL	T Physique des solides (Or-
SOUCHAY	T Chimie générale		say).
AIGRAIN	T Electrotechnique géné-	M. JULIA	T Etudes des moléculaires
	rale.		complexes.
BRUSSET	T Chimie systématique.	LENDER	T Biologie animale
M. LÉVY	T Physique théorique des		S.P.C.N. Orsay.
	hautes énergies. (Or-	MAGAT	T Physico-chimie des radio-
	say).		éléments
Mme CHAIX	T Chimie biologique.	Mlle QUINTIN	T Electrochimie.
Mme HUREL-PY	T Biologie végétale P.C.B	MONOD	T Chimie du métabolisme.
PANNETIER	T Chimie générale.	BENOIT	T Physiologie animale (Or-
BRUN	T Mécan. des fluides I.		say).
LEDERER	T Chimie biologique (Or-	DE POSSEL	T Analyse numérique.
	say).	CHARLOT	T Chimie analytique.
Mme DUBREIL	T Mathématiques (Agréga-	LEME	T Ecologie Vég.
	tion).		(Orsay).
Mme LELONG	T Mathémat. II E.N.S.	GUERIN	T Chimie M.P.C. (Orsay)
BELLAIR	T Géologie S.P.C.N.	CHATELET M.	T Chimie P.C.B.
COTTE	T Physique électricité.	JEAN	T Physique nucléaire (Orsay)
DUBOIS J.-E.	T Chimie organique.	MATTLER	T Physique S.P.C.N.
LAMOTTE	T Zoologie E.N.S.	BERGERARD	T Zoologie (Orsay).
MICHEL A.	T Chimie minérale (Orsay).	BERTEIN	T Electronique (Orsay).
OLMER	T Energétique générale.	BOUSSIÈRES	T Radiochimie.
ROUAULT	T Electricité (Orsay).	Mme COUTURE	T Thermodynamique et Mé-
GAUTHIER	T Mécanique appliquée.		can. physique.
BARCHEWITZ	T Chimie physique.	ELLENBERGER	T Géologie des grandes ré-
BROSSEL	T Physique atomique.		gions du globe (Orsay).
BUSER	T Physiologie comparée.	FRANC	T Biologie animale P.C.B.
CAMUS	T Physiologie végét. (Ors.).	SCHNELL	T Botanique tropicale.
CASTAING	T Phys. II thermo (Orsay).	STOLKOWSKI	T Physiologie végétale.
CURIEN	T Minéralogie et Cristallographie.	ACHER	T Chimie biologique.
		BAUDOIN	T Biologie animale P.C.B.
MOYSE	T Physiologie végétale	BEAUMONT	T Biologie animale S.P.C
	(Orsay).		N.
Mme CHARNIAUX-		BLAMONT	T Géophysique ionosphère.
COTTON	T Evolution des êtres organ-	BOUREAU	T Botanique.
	nisés.	CURIE D.	T Physique M.G.P.
POSSOMPES	T Zoologie.	DURAND-DELGA	T Géologie.
PULLMANN	T Chimie quantique.	FREON	T Chimie organique (Orsay).
TEILLAC	T Physique nucléaire et	HELLER	T Physiologie végétale.
	radioactivité (Orsay).	TORTRAT	T Calcul des Probabilités.
TONNELAT	T Biologie physico-	CAILLEUX	T Géologie S.P.C.N.
	chimique (Orsay).	MAGNAN	T Physique S.P.C.N.
VILLE	T Econométrie.	DAUDEL	T Mécanique ondulatoire
WILLEMART	T Chimie P.C.B.		appliquée à la Chimie
DODÉ	T Chimie (Orsay).		théor. et la Phys. nu-
FREYMANN	T Recherches physiques.		cléaire.
GUINOCHE	T Biologie vég. S.P.C.N.	Mlle FOURCROY	T Biologie végétale S.P.C
	(Orsay).		N.
ROLLET	T Chimie minérale.	Mme CHOQUET-BRU-	
Mlle JOSIEN	T Chimie S.P.C.N.	HAT	T Méc. analytique et Méc.
CHEVALLEY	T Géométrie algébrique et		céleste.
	théorie des groupes.	Mlle VEIL	T Physiologie générale.
ARNOULT	T Electronique (Orsay).	LWOFF	T Microbiologie.
CHAPPELLE	T Physique I (Orsay).	SIESTRUNCK	T Mécan. physique et ex-
DELANGE	T Mathématiques I (Orsay).		périmentale.
DENY	T Mathématiques générales	LACOMBE	T Metallurgie des métaux
	(Orsay).		nucléaires (Orsay).
G RMAIN P.	T Mécanique théorique des	BROCHARD	T Physique P.C.B. (Orsay).
	fluides.	CABANNES	T Mécanique générale.
LUCAS G.	T Géologie.	LESIEUR	T Mathématiques I (Orsay).

MAZET	T Mécanique générale (Orsay).	DELCROIX	T Physique théorique (Orsay).
CAIRE	Géographie physique et Géologie dyn.	GOURDIN	Phys. Théor. des Hautes-Energies (Orsay).
COMOLET	T Mécanique des Fluides.	LEHMANN	T Phys. Exp. des Hautes-Energies (Orsay).
CORABEUF	T Physiologie animale (Orsay).	NATAF	T Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
DELLOUE	T Physique de l'Exosphère.	ECHALIER	Biologie animale PCB.
GORENFLOT	Botanique II (Orsay).	BARRAUD	Physiologie cellulaire.
HOUILLO	Biologie animale P.C.B.	LIORET	Physiologie végét. Orsay.
JULLIEN J.	Chimie SPCN (Orsay).	DARS	Géologie struc. et Geol. appliquée.
MALGRANGE	T Technique mathématique de la Phys. (Orsay).	CAMEFORT	T Botanique ((agrégation).
OLIVIER	Anthropologie.	VICHNEVSKY	T Mécanique industrielle.
NOZERAN	T Botanique II (Orsay).	BLAQUIERE	Electronique (Orsay).
BLANC-LAPIERRE ..	T Physique E.N.S. (Orsay).	ARNOUS	T Physique théorique.
CHEVAUGEON	T Botanique (Orsay).	TATIBOUET	Chimie (CSU Orléans).
KAHANE	T Mathématiques (Orsay).	MALLIavin	T Mathématique propé. (Orsay).
SAMUEL	T Mathématiques ENS féminines.	GAUDEMAR	Chimie Propé.
KOURGANOFF	T Astronomie (Orsay).	PEREZ Y JORBA	Phys. Exp. des Hautes-énergies (Orsay).
THIRY	T Mécanique céleste.	DAVID	T Chimie (Agrég. Orsay).
ABELES	Physique SPCN.	BROUSSE	T Mécanique théorique.
AMAT	T Physique PCB.	ROSCH	T Astronomie.
AUBOIN	T Géologie.	GUY	T Physique expérimentale.
Mme BENOIT-GUEUTAL ..	T Phys. Nucléaire et radioactivité (Orsay).	LAZARD	Math. M.P.C.
BOUGIS	Biologie marine (Villefranche-sur-Mer.)	MOREL Pierre	Physique M.P.C.
BRUHAT	T Mathématiques MPC.	ARSAC	Programmation.
BRUNN	T Géologie historique (Orsay).	LEFEBVRE	Chimie M.P.C.
CHABRAL	T Physique MGP (Orsay).	CHAPEVILLE	Biochimie.
DEHEUVELS	T Mathématique Propé.	BENOIT	Physique C.P.E.M.
D'ESPAGNAT	T Physique théorique (Orsay).	Rio	Chimie C.P.E.M.
FURON	T Géologie SPCN.	JAUZEIN	Géologie, E.N.S.
Mme GANS	T Génétique.	PREVOST Georges ..	B.V. C.P.E.M.
GENEVES	Biologie végétale PCB.	FAVARD P.	B.A. C.P.E.M.
GUILBERT	Physique (CUS Orléans)	VILKAS	Chimie C.P.E.M.
HUPE	T Pétrographie.	M ^{lle} FICINI	Chimie C.P.E.M.
HOLLANDE	T Biologie générale.	LEQUEUX	Astronomie.
LIONS	T Analyse numérique.	COHEN TANNODJI ..	Physique M.P.C.
MAITTE	T Chimie PCB.	TAVERNIER	Physique C.P.E.M.
MEYER	Physique propédeutique.	M ^{me} ROIZEN	Physique C.P.E.M.
NICOLAS	Géologie appliquée.	DURAND M.	B.A. S.P.C.N.
PANIGEL	Biologie générale.	PASCAUD	Physiologie.
RAVIER	Pétrographie.	M ^{me} PETIT	B.A. C.P.E.M.
ROSEAU	T Méca. théor. des fluides.	BROUSSE	Géologie (Orsay)
ROUBINE	T Electronique.	CAGNIAC	Physique (agrégation Orsay).
SILBER	T Chimie PCB.	LEBERRE	Zoologie (Orsay).
UEBERSFELD	T Electronique.	SCHAEFFER	Microbiologie (Orsay).
YVON	T Théories Physiques.	De GENNES	Physique des solides (Orsay).
HERVE	T Mathématiques.	RIOU	Physique nuclé. exp. (Orsay).
NERON	T Mathémat. MPC (Orsay).	CLAUSER	Chimie biolo. (Orsay).
Mme PECKER-WIMEL	T Astrophysique.	CHEVALIER	Physio. animale (Orsay).
BALKANSKY	Physique MPC.	JANCOVICI	Physique atomique (Orsay).
LE CORRE	T Electricité.	FALK-VAIRANT	Physique nucléaire (Orsay).
		FETIZON	Chimie propé. (Orsay)
		CERF	Mathématiques (Orsay).

Secrétaire Général.... R. POULLAIN

A LA MÉMOIRE DE HENRI LENORMANT

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

*qui guida mes premiers pas
dans la Recherche.*

A MA FEMME,

A TOUS LES MIENS,

Ce travail a été effectué dans le Service de Biophysique de l'Institut de Biologie Physicochimique, sous la direction de Mme Françoise LABEYRIE, Directeur de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique. Je suis heureux de lui exprimer ici ma profonde reconnaissance pour la bienveillante attention avec laquelle elle a guidé mon travail, et pour les nombreux encouragements et les précieux conseils qu'elle m'a prodigués jusqu'au terme de cet ouvrage.

Je tiens à témoigner ma respectueuse gratitude à Monsieur le Professeur René WURMSER, qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire, me faisant bénéficier de son précieux enseignement, et à M^{me} Sabine FILITTI-WURMSER, pour l'intérêt constant qu'ils ont porté à mes recherches.

Je remercie très vivement Monsieur le Professeur Jacques TONNELAT qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur Piotr. P. SLONIMSKI pour l'intérêt profond qu'il a manifesté pour mon travail, pour ses conseils judicieux, pour les suggestions très intéressantes qu'il m'a faites, ainsi que pour la grande attention avec laquelle il a examiné mon manuscrit de thèse.

Monsieur M. IWATSUBO m'a fait profiter de sa grande expérience à l'occasion de nombreuses et fructueuses discussions. C'est sur ses conseils que j'ai utilisé une technique grâce à laquelle une grande partie de ce travail a pu être réalisée (préparation de l'Apo-L-Lactico-déshydrogénase). Qu'il soit assuré de toute ma reconnaissance.

Le présent travail n'aurait pu être mené à bien sans la collaboration efficace de mon ami Athanase SPYRIDAKIS qui a su, avec une régularité remarquable, réussir les délicates préparations du matériel enzymatique. J'adresse également mes remerciements sincères à M^{lle} L. NASLIN dont l'aide active m'a été très précieuse pour la résolution de nombreux problèmes matériels.

Enfin, que tous mes camarades des différents laboratoires, envers qui j'ai une dette de reconnaissance pour un conseil, une technique ou l'obtention d'un produit, soient assurés de toute ma sympathie.

SOMMAIRE.

INTRODUCTION GÉNÉRALE	13
PREMIÈRE PARTIE : MISE EN ÉVIDENCE DU RÔLE DE LA FLAVINE PAR L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS DE L'APO-L-LACTICO- DÉSHYDROGÉNASE	
Introduction	21
Matériel et techniques	22
1°) L-lactico-déshydrogénase (L-LDH)	22
a — Préparation	22
b — Propriétés spectrales	24
2°) Apo-L-lactico-déshydrogénase (Apo-L-LDH)	26
a — Apo-L-LDH _{brute}	26
b — Apo-L-LDH _{Sephadex}	26
3°) Substrat, accepteurs, flavines	26
4°) Mesure des concentrations d'enzyme	27
5°) Mesure de l'activité enzymatique	27
a — Essai standard de la L-LDH	27
b — Essai standard de l'Apo-L-LDH	28
c — Essais avec le ferricytochrome c.....	28
d — Définition de l'activité molaire	28
6°) Ultracentrifugation analytique	29
Résultats expérimentaux	30
I. — Détachement spontané du FMN et inactivation de la L-LDH par vieillissement	30
1°) Stabilité des solutions fraîches de L-LDH	30
2°) Propriétés de la L-LDH partiellement inactivée par vieillissement	31
3°) Dissociation du FMN et inactivation	33
II. — Séparation du FMN en milieu acide ; étude de l'Apo-L-LDH formée	34
1°) Etude des propriétés physicochimiques de la L- LDH et de l'Apo-L-LDH	34
a — Bilans	34
b — Spectres	36
c — Ultracentrifugation analytique	38
2°) Etude des propriétés enzymatiques	39

a — Activité résiduelle, réactivation spécifique de l'Apo-L-LDH	39
b — Non réductibilité du constituant cytochromique de l'Apo-L-LDH par le lactate	41
3°) Cristallisation de la L-LDH reconstituée	46
Discussion	47
DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE ENZYMATIQUE DE L'ÉQUILIBRE D'ASSOCIATION DE LA FLAVINE A L'HÉMOProtéINE ..	
Introduction	51
Matériel et techniques	51
Résultats expérimentaux	52
I. — Etude de la combinaison de l'Apo-L-LDH avec le FMN	52
1°) Variation de la vitesse de la réaction catalysée avec la concentration de FMN ; effet de la riboflavine et des ions phosphate et pyrophosphate	52
2°) Détermination de la valeur de la constante de dissociation du complexe Apo-L-LDH-FMN par une méthode de dilution	54
a — Mesure de $(AF)/(A)_{tot.}$ dans les dilutions	55
b — Calcul de la valeur de K	56
c — Résultats expérimentaux	56
3°) Variation de l'affinité apparente pour le L-lactate avec le taux de saturation en flavine de l'Apo-L-LDH	58
a — Indices de l'existence de cet effet	59
b — Stabilisation de l'Apo-L-LDH par la sérum-albumine	59
c — Variation de K'_m (L-lactate) en fonction de la concentration de flavine	61
II — Etude comparée des propriétés cinétiques des L-LDH non traitée et reconstituée (Apo-L-LDH + FMN saturant)	62
1°) Effet de la température sur la vitesse maximale ..	62
2°) Effet du pH sur K_m et V	63
3°) Inhibition par le D-lactate et l'oxalate	66
Discussion	68
TROISIÈME PARTIE : ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE L'OXYDORÉDUCTION DES GROUPES PROSTHÉTIQUES FLAVINIQUE ET CYTOCHROMIQUE	
Introduction	74
Matériel et techniques	76
1°) Préparation de la L-LDH et de l'Apo-L-LDH (apo-enzyme sans flavine)	76
2°) Solutions de L-lactate et de Bleu de Méthylène	76
3°) Mesure des pH	76
4°) Titrage de la L-LDH par le L-lactate	76

Résultats expérimentaux	77
1°) Etude spectrale du FMN fixé sur la L-LDH	77
2°) Titrage de la L-LDH oxydée par le L-lactate : répartition des électrons entre le constituant cytochromique et la flavine de l'enzyme	80
3°) Mesure du potentiel d'oxydoréduction des deux groupes prosthétiques	82
4°) Potentiel d'oxydoréduction du constituant cytochromique porté par la L-LDH, l'Apo-L-LDH et la L-LDH reconstituée	85
Discussion	85
DISCUSSION GÉNÉRALE	90
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS	99
BIBLIOGRAPHIE	102

INTRODUCTION GÉNÉRALE.

Parmi les enzymes actuellement connus qui catalysent l'oxydo-réduction du couple lactate/pyruvate, il convient de séparer deux classes nettement distinctes. Ces deux classes sont largement représentées dans le monde vivant puisqu'on les rencontre aussi bien dans les tissus animaux que dans les levures ou dans certaines bactéries.

D'une part, il existe un groupe d'enzymes dont l'activité est strictement dépendante du système des coenzymes de type nicotinamide-adénine-dinucléotides (NAD ou NADP). A pH neutre, le rôle principal de ces enzymes est de réduire le pyruvate après combinaison avec le coenzyme réduit qui sert de donneur d'électrons. C'est le cas de la lacticodéshydrogénase classique du muscle. D'autre part, un second groupe, indépendant de ces mêmes coenzymes (NAD ou NADP), est représenté, en particulier chez la levure, par plusieurs lacticodéshydrogénases qui catalysent la déshydrogénation du lactate en pyruvate en présence d'accepteurs d'électrons variés de potentiels d'oxydo-réduction relativement élevés.

Chez la levure, on connaît trois lacticodéshydrogénases (LDH) distinctes dont deux sont inductibles au cours de l'adaptation respiratoire. Ces enzymes diffèrent entre eux par de nombreux caractères : stéréospécificité vis-à-vis des isomères du lactate (D et L-LDH), spécificité pour les accepteurs d'électrons dans la réaction catalysée, en même temps que par la nature de leurs groupes prosthétiques. La L-LDH, la plus anciennement connue, est un *flavohémoenzyme* dont les groupes prosthétiques sont le protohème et le phosphate de riboflavine (FMN) ; elle catalyse la déshydrogénation du L-lactate en présence de divers colorants (ferricyanure, bleu de méthylène, etc.) ou de ferricytochrome c qui est l'accepteur physiologique probable, d'où le nom officiel de cet enzyme : L-lactate : cytochrome c oxydoréductase EC 1.1.2.3. [1]. Les deux D-lacticodéshydrogénases sont des métallo-flavoenzymes (Zn^{++} et FAD) qui diffèrent par leur spécificité vis-à-vis des accepteurs : la D-LDH fonctionne en présence de divers colorants (ferricyanure, 2,6-Dichlorophénol-indophénol, etc.) mais pas avec le cytochrome c, tandis que la D-LCR (D-lactate : cytochrome c réductase) ne transfère les électrons du D-lactate qu'au cytochrome c.

La L-LDH ayant été l'objet d'un nombre important de travaux, il convient de rappeler, dans une revue bibliographique, les principales connaissances qui avaient été acquises ainsi que les problèmes qui étaient restés posés lorsque nous avons entrepris notre travail, afin d'en préciser le cadre et l'orientation.

C'est BERNHEIM [2] qui, dès 1928, avait découvert qu'un extrait alcalin de la poudre acétonique de levure de Delft contenait un facteur catalysant l'oxydation du lactate. Par la suite, les noms de BACH, DIXON, ZERFAS et KEILIN sont attachés aux premiers travaux concernant les propriétés et la purification de cette lacticodéshydrogénase [3, 4, 5]. Au cours d'essais systématiques de purification de cet enzyme, ils ont constaté un parallélisme étroit entre les variations des deux facteurs suivants : (1) l'activité lacticodéshydrogénasique et (2) la teneur des extraits en un constituant cytochromique soluble du type « b » qu'ils ont appelé *Cytochrome b₂*. Ils ont ainsi mis en relief les caractères nouveaux et particuliers de cette lacticodéshydrogénase, montrant que son fonctionnement n'était pas lié aux coenzymes de type NAD ou NADP, contrairement à la lacticodéshydrogénase du muscle déjà connue, mais semblait dépendre d'un constituant cytochromique soluble et éventuellement d'une flavine qu'ils n'avaient toutefois pas pu mettre en évidence.

L'utilisation constante du verséne (EDTA) et du lactate comme stabilisateurs de l'enzyme est un des facteurs décisifs qui ont permis plus tard à d'autres groupes de chercheurs de pousser plus avant la purification par des méthodes diverses. La présence d'une flavine liée à l'enzyme a pu alors être décelée [6, 7, 8] et celle-ci a été identifiée au FMN par chromatographie et fluorimétrie. Enfin, après avoir réussi à cristalliser cette lacticodéshydrogénase, APPLEBY et MORTON [6, 9] ont démontré qu'elle contient une molécule de FMN et une molécule de protohème pour environ 80.000 grammes de protéine.

La L-LDH de la levure présente donc la particularité très rare de posséder deux groupes prosthétiques organiques différents. Il est très intéressant de savoir si ces deux groupes participent effectivement à la fonction catalytique et dans quel ordre les électrons provenant du lactate leur sont délivrés puis transférés aux accepteurs.

En ce qui concerne l'hème, BACH et al. [5] avaient observé que le spectre cytochromique de la L-LDH subissait une modification lors de l'addition de lactate, les bandes d'absorption prenant l'aspect caractéristique du cytochrome réduit. Ce phénomène a été confirmé et décrit en détail par APPLEBY et MORTON [6, 10] qui ont déterminé les valeurs des extinctions des différentes bandes d'absorption des formes oxydée et réduite de la L-LDH cristallisée.

On a pensé que la flavine était également fonctionnelle à la suite d'observations concernant des processus variés d'inactivation de la L-LDH. APPLEBY et MORTON [6, 10] ayant remarqué que le FMN fixé sur la L-LDH n'est pas fluorescent, même à l'état oxydé, l'apparition de fluorescence dans les solutions de L-LDH a été généralement assimilée au détachement de la flavine. Or, on a observé un certain parallélisme entre l'apparition de fluorescence et l'inactivation irréversible de l'enzyme dans diverses circonstances : au cours de l'exposi-

tion à l'oxygène [11], ou de dialyses de longue durée [6, 8, 12], sous l'action d'agents chimiques particuliers comme le parachloromercuri-phénylsulfonate [11], l'anhydride acétique [13] ou l'urée [14, 15] ou simplement par modification du pH [8, 10]. Malgré l'absence d'études concomitantes précises de ces deux phénomènes, perte d'activité et fluorescence, l'ensemble de ces observations suggère que le détachement de la flavine entraîne la perte du pouvoir catalytique. Une restriction s'impose toutefois puisqu'il pourrait s'agir de deux conséquences indépendantes d'un même phénomène, une dénaturation par exemple. *L'irréversibilité apparente de la dissociation du FMN est un point important sur lequel les différents auteurs ont toujours beaucoup insisté* [8, 10, 11, 12]. Enfin, bien qu'il ait été généralement admis que le FMN lié à l'enzyme soit réduit en présence de lactate, aucune preuve expérimentale décisive n'avait été apportée à ce sujet ; la difficulté provient du fait que les méthodes optiques habituelles ne permettent pas de répondre à cette question puisque, d'une part, le FMN prosthétique n'est pas fluorescent même à l'état oxydé, et que, d'autre part, l'intensité du spectre cytochromique ne permet pas d'observer les variations spectrales du FMN lors de son éventuelle réduction.

MORTON et ses collaborateurs, ainsi que MAHLER et HINKSON plus récemment, ont étudié en détail la constitution et certaines propriétés physiques de la molécule de L-LDH. On sait ainsi que l'enzyme cristallisé contient une proportion constante (6 p. 100 en poids) d'un poly-désoxyribonucléotide de composition bien définie [16, 17, 18]. Ce DNA dont la fonction reste inconnue peut être détaché de la protéine par le sulfate d'ammonium [16] sans modification des propriétés catalytiques de la L-LDH ; le dérivé de l'enzyme ainsi obtenu (L-LDH Type 2 de MORTON et al.) a pu être cristallisé mais dans des conditions un peu différentes de celles utilisées pour cristalliser le DNA-enzyme (L-LDH Type 1 de MORTON et al.) [19]. Le poids moléculaire du DNA détaché de la L-LDH cristallisée n'est pas encore connu avec certitude [20].

La composition en acides aminés d'échantillons cristallisés de L-LDH a été déterminée indépendamment par APPLEBY et al. [21] et par HINKSON [22] ; les résultats obtenus montrent quelques différences qui pourraient être dues à l'hétérogénéité des souches de levure utilisées dans ces deux laboratoires.

La L-LDH est inactivée par les réactifs des groupes sulfhydryles ainsi que nous l'avons déjà indiqué ; en fait, cet enzyme contient, par mole d'hème, 4 à 6 groupes réagissant avec les composés mercuriels (PCMB ou PCMS) [15, 22]. L'hypothèse de la participation d'un de ces groupes à la liaison de la flavine a été émise par ARMSTRONG et al. [11] mais les arguments avancés par ces auteurs ne sont pas convaincants.

La L-LDH recristallisée montre un seul constituant à l'électrophorèse entre pH 5 et 8 [16, 23]. Les méthodes hydrodynamiques ont été utilisées par ARMSTRONG et al. pour estimer son poids moléculaire [23]. Selon ces auteurs, la meilleure valeur pour le poids moléculaire, cal-

culée à partir des valeurs des coefficients de diffusion et de sédimentation, serait 183.000 pour l'enzyme contenant le DNA. Toutefois, la L-LDH présente un comportement très particulier dans la technique d'approche de l'équilibre de sédimentation, ce qui a conduit ARMS-TRONG et al. à émettre l'hypothèse de l'existence, en solution, d'un équilibre dynamique rapide entre plusieurs formes polymères de la L-LDH. Jusqu'à présent, il n'a pas été possible de savoir si l'unité moléculaire 183.000 est constituée ou non de deux sous-unités comme pourrait l'indiquer le fait qu'il y a dans la L-LDH une mole de FMN et une mole de protohème pour environ 80.000 grammes de protéine.

Le comportement enzymatique de la L-LDH a été éclairé par un nombre considérable de résultats concernant des substrats, des accepteurs et des inhibiteurs avec lesquels elle réagit.

La stricte stéréospécificité envers l'isomère L- du lactate a été établie par BOERI et al. [7]. Plusieurs autres α -hydroxyacides monocarboxyliques de la série L- peuvent être oxydés mais plus difficilement que le L-lactate [10, 24], tandis que leurs isomères D- sont généralement des inhibiteurs compétitifs [25, 26, 27].

L'oxydation du L-lactate peut se faire en présence d'accepteurs variés de potentiels relativement élevés [26, 28] : colorants comme le ferricyanure, le bleu de méthylène, le 2,6-Dichlorophénolindophénol etc., ou bien en présence de cytochrome c. La vitesse spécifique d'oxydation du L-lactate étant relativement indépendante de la nature de l'accepteur, il semble que le transfert des électrons à l'accepteur ne puisse être l'étape limitante de la réaction globale. L'oxygène est également un accepteur possible mais peu efficace comme l'ont montré BOERI et RIPPA [29].

La réaction inverse pyruvate $\longrightarrow$ L-lactate doit pouvoir se faire, en présence de donneurs d'électrons de potentiels d'oxydo-réduction très bas, mais pratiquement, elle n'a pas été mise en évidence avec certitude. Les donneurs du type NAD ou NADP réduits sont inertes vis-à-vis de cet enzyme, comme nous l'avons déjà mentionné ; des essais effectués avec le FMN réduit par BOERI et TOSI [30] ont montré la formation de traces de lactate à partir du pyruvate.

Le « centre actif » d'un enzyme peut être défini comme l'ensemble des éléments de la protéine qui constituent des facteurs essentiels à la fonction de catalyse. On imagine généralement que ces éléments essentiels sont groupés à proximité les uns des autres dans l'espace, c'est pourquoi on parle d'un centre actif. Les éléments constitutifs du centre actif ne sont généralement pas voisins sur la chaîne polypeptidique primaire mais sont regroupés lors de l'établissement des structures secondaire et tertiaire de la protéine. Plusieurs exemples, dont celui de l'hémoglobine [31], montrent en effet que des perturbations de structure, même induites par des modifications portant sur des groupes distants des éléments essentiels, peuvent influencer les propriétés fonctionnelles de ces derniers.

Les éléments assurant la liaison des groupes prosthétiques à la protéine, dans la L-LDH, sont peu connus. Dans le cas de la flavine, ARMSTONG et al. [11] ont obtenu quelques indices de la participation à la liaison de groupes sulphydryles qui seraient très autoxydables, ce dernier caractère pouvant expliquer l'irréversibilité apparente de la dissociation. Les arguments présentés par ces auteurs ne sont toutefois pas décisifs et nous aurons l'occasion de les discuter. En ce qui concerne l'hème, celui-ci est très fortement lié à la protéine ; il a pu cependant être détaché par l'acétone acide [32] mais au prix d'une dénaturation intense. La nature hémochromogène du spectre cytochromique de la L-LDH tient sans doute à l'existence de deux liaisons de coordination entre les positions 5 et 6 de l'atome de fer et des groupes basiques de la protéine [26]. YAMASHITA et al. [33] ont pu cristalliser, à partir des extraits de levure, une hémoprotéine inactive enzymatiquement qui dérive vraisemblablement de la L-LDH ; son poids moléculaire est environ 20.000. Ce « petit cytochrome b_2 » est probablement un produit de coupure de la L-LDH ; en effet, l'hydrolyse trypsique poussée de cet enzyme produit également une hémoprotéine de faible poids moléculaire dont le spectre cytochromique est très voisin de celui de la L-LDH [34]. Les maxima des bandes d'absorption du spectre cytochromique sont situés aux mêmes longueurs d'onde, les extinctions molaires sont légèrement diminuées pour le « petit Cytochrome b_2 » ; par conséquent, la coupure d'une grande partie de la protéine n'affecte que très peu le spectre cytochromique de la L-LDH. Cette hémoprotéine dérivée de la L-LDH peut, comme le cytochrome c, servir d'accepteur d'électrons dans la réaction catalysée mais avec une vitesse d'échange beaucoup plus lente [35].

On ne dispose actuellement que de très rares informations sur les éléments constitutifs du centre actif, autres que les groupes prosthétiques. Des expériences de DIKSTEIN [25] et de NYGAARD [27] ont montré qu'une charge positive portée par la protéine intervient dans la fixation de l'ion lactate. D'autre part, NYGAARD [36] a découvert une inhibition de l'enzyme par les polycations et quelques protéines basiques, de caractère compétitif avec le cytochrome c ; cette observation suggère que des groupes ionisés complémentaires de ceux de cet accepteur participent à sa fixation par l'établissement de forces électrostatiques.

Les connaissances concernant le mécanisme de transfert des électrons depuis le lactate jusqu'aux accepteurs par l'intermédiaire de ce flavohémoenzyme se résument de la manière suivante :

(1) on sait que l'hème est réduit en présence de lactate ; en ce qui concerne la flavine, les différents auteurs ont admis qu'elle est également réduite par le substrat, mais la preuve n'en a pas été apportée.

(2) des données purement cinétiques très approfondies, obtenues en faisant varier les concentrations de substrat et de différents accep-

teurs, ont conduit MORTON et ses collaborateurs [26] et HINKSON et MAHLER [37] à admettre le schéma réactionnel suivant : le lactate réduit la flavine qui réduit ensuite l'hème ; le ferricyanure (au moins aux fortes concentrations) n'échangerait les électrons qu'avec la flavine, probablement en formant un complexe triple enzyme-substrat-accepteur ; d'autres accepteurs comme le 2,6-Dichlorophénol-indophénol ou le ferricytochrome c réoxydéraient l'hème réduit par la flavine, après dissociation du pyruvate formé. Dans ce schéma, il est implicite que *l'échange des électrons entre la flavine et l'hème du constituant cytochromique de la L-LDH serait un processus intramoléculaire.*

Un point particulièrement important concernant le mécanisme résulte du fait que la L-LDH qui reçoit 2 H (ou $2 \text{ H}^+ + 2 \text{ e}$) du L-lactate fonctionne avec des accepteurs monoélectroniques ou diélectroniques. Dans la mesure où, selon le schéma de MORTON et al., le ferricyanure (monoélectronique) serait réduit par la flavine, tandis que l'hème (monoélectronique) réduirait des colorants diélectroniques aussi bien que le cytochrome c, un problème très intéressant se trouve posé. La participation d'une forme semiquinonique de la flavine échangeant les électrons un par un avec le lactate, a été envisagée par BOERI et CUTOLO [38] et par MORTON et al. [26], mais n'a pas été mise en évidence analytiquement jusqu'à ce jour. Dans le cas de la réduction des colorants diélectroniques par l'hème, il conviendrait d'envisager soit une réduction par deux collisions successives entre une molécule de colorant et un ou deux groupes hématiniques réduits, soit une fixation du colorant oxydé ou demi-réduit à proximité immédiate de l'hème.

Dans cette revue bibliographique rapide, nous avons essayé de dégager les résultats les plus importants qui ont été acquis depuis la découverte de la L-LDH de la levure. Malgré l'accumulation d'un grand nombre d'observations, on doit constater que bien des aspects fondamentaux du fonctionnement de cet enzyme restent peu connus. Or, l'étude de la L-LDH présente un intérêt très particulier pour la compréhension des mécanismes d'oxydo-réduction enzymatique. Cet intérêt vient essentiellement du fait que cette lactico-déshydrogénase est le seul enzyme d'oxydo-réduction connu, existant dans un état moléculaire bien défini, qui possède à la fois deux groupes prosthétiques organiques différents (FMN et protohème). Cette propriété exceptionnelle avait conduit certains auteurs à comparer la L-LDH à une chaîne respiratoire miniature où la fonction de déshydrogénation serait assurée par la flavine, alors que le groupe cytochromique ne jouerait que le rôle de transporteur interne obligatoire vers les accepteurs. En fait, la situation est plus complexe puisque l'unité moléculaire mise en évidence par les méthodes hydrodynamiques comporte deux molécules de FMN et deux hèmes. Il est donc possible d'envisager, comme l'ont fait MORTON et ses collaborateurs, que les quatre groupes prosthétiques de cette unité soient susceptibles d'interactions dans un arrangement

structural particulier et que, dès lors, il devienne illusoire de chercher à individualiser les deux fonctions de déshydrogénation du substrat et de transfert des électrons aux accepteurs externes.

En fait, comme nous l'avons déjà fait remarquer, l'étude du transfert des électrons dans la L-LDH n'a été abordée que par une voie très indirecte, par l'analyse détaillée des données cinétiques relatives à la réaction catalysée. Il est possible, en effet, comme l'ont fait MORTON et ses collaborateurs et MAHLER et HINKSON, d'envisager différents mécanismes et d'établir, dans chaque cas, les équations qui relient les constantes cinétiques habituelles et les concentrations des réactifs (substrat et accepteurs variés). Toutefois, il est important de souligner que l'accord entre ces prévisions théoriques et les observations expérimentales ne suffit pas à assurer que le mécanisme en question soit le seul possible. Par conséquent, savoir dans quel ordre les électrons provenant du L-lactate sont distribués aux groupes prosthétiques puis transférés aux accepteurs externes restait un problème à résoudre.

La présence de quatre groupes prosthétiques (deux FMN et deux protohèmes) dans l'unité moléculaire stable en solution, la seule actuellement connue, confère un intérêt très particulier à la recherche d'éventuelles interactions soit entre les groupes prosthétiques eux-mêmes, soit encore entre ceux-ci et le substrat ou ses analogues. Ce genre d'informations présente une importance capitale pour la compréhension des relations entre structure et fonction de cet enzyme.

D'autres questions, d'importances inégales, signalées dans la revue précédente, pourraient encore être soulevées, mais nous avons voulu insister surtout sur les deux problèmes précédents parcequ'ils ont été le centre d'intérêt du présent travail.

Dans notre travail nous avons abordé l'étude du problème du mécanisme de fonctionnement de la L-LDH en essayant de dégager les rôles respectifs de chacun de ses deux groupes prosthétiques dans la réaction catalysée.

Des perspectives nouvelles pour une étude plus directe de ce problème sont apparues lorsque nous avons pu préparer, par dissociation de la flavine, un apoenzyme (hémoprotéine sans flavine = Apo-L-LDH) spécifiquement réactivable à des taux très élevés par le FMN. Ce succès a été obtenu en traitant la L-LDH par le sulfate d'ammonium acide selon une variante de la technique classique de WARBURG et CHRISTIAN mise au point par M. IWATSUBO pour la D-LDH de la levure anaérobie [39]. Indépendamment, MORTON [40] est arrivé au même résultat dans des conditions très voisines.

Dans une première partie, nous décrirons les propriétés physico-chimiques et enzymatiques de l'Apo-L-LDH. Cette étude nous conduira à démontrer que le groupe flavinique est un intermédiaire essentiel au transfert des électrons provenant du L-lactate aux accepteurs externes aussi bien qu'au constituant cytochromique de l'enzyme lui-même.

Dans la seconde partie, l'étude de l'équilibre d'association du FMN avec l'Apo-L-LDH apportera quelques informations sur la liaison de la flavine à la protéine. Nous présenterons, en outre, des expériences qui montrent qu'il existe une interaction entre le site récepteur du substrat et le groupe flavinique.

Enfin, la troisième partie sera consacrée à l'étude des propriétés d'oxydo-réduction des deux groupes prosthétiques. Le nombre d'électrons liés à l'oxydo-réduction de chacun de ces groupes ainsi que leur potentiel d'oxydo-réduction seront déterminés au cours de titrages anoxyques de la L-LDH oxydée par le L-lactate.

PREMIÈRE PARTIE.

MISE EN EVIDENCE DU RÔLE DE LA FLAVINE PAR L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS DE L'APO-L-LACTICODÉSHYDROGÉNASE,

INTRODUCTION.

La L-lacticodéshydrogénase (L-LDH) de la levure de boulangerie (L-lactate : cytochrome c oxydo-réductase, EC 1.1.2.3.) présente la particularité très rare de posséder deux groupes prosthétiques différents. En effet, après avoir obtenu les premières préparations cristallisées de cet enzyme, APPLEBY et MORTON [1] ont montré qu'il s'agit d'un flavohémoenzyme contenant le protohème et le phosphate de ribo-flavine (FMN) en proportion équimoléculaire. A peu près simultanément, BOERI et al. [2] obtenaient ce même résultat par l'analyse d'échantillons de L-LDH obtenus sous une forme hautement purifiée quoique non cristallisée. La présence du groupe hématinique, qui confère à la L-LDH un spectre cytochromique particulier, a conduit certains auteurs à utiliser le terme « Cytochrome b_2 » pour désigner cet enzyme.

Un des problèmes les plus intéressants que pose l'étude de la L-LDH est de savoir si ces deux groupes participent effectivement à la fonction catalytique et de connaître leur rôle respectif dans la réduction des différents accepteurs. Un schéma réactionnel compatible avec l'analyse des données purement cinétiques obtenues en faisant varier les concentrations de substrat et de différents accepteurs a été proposé par MORTON et al. [3]. Selon ce schéma, certains accepteurs comme le ferricyanure recevraient les électrons de la flavine en formant un complexe triple enzyme-substrat-accepteur ; d'autres comme le 2,6-Dichlorophénolindophénol (2,6-DCIP) ou le cytochrome c recevraient les électrons de l'hème après dissociation du pyruvate formé. Dans ce dernier cas, MORTON et ses collaborateurs supposent que le transfert des électrons entre les groupes prosthétiques flavinique et cytochromique serait *intramoléculaire*. Dans un travail similaire, HINKSON et MAHLER [4] ont confirmé et étendu les interprétations de MORTON et al. avec toutefois quelques différences puisque le ferricyanure aux faibles con-

centrations réagirait principalement sur le constituant cytochromique de l'enzyme réduit et qu'il en serait de même pour le 2,6-DCIP. Une réserve de portée générale doit être faite sur ce point : l'accord entre les données cinétiques expérimentales et celles que l'on peut prévoir à partir d'un schéma réactionnel ne suffit pas à établir l'exactitude de ce dernier ; il n'est pas exclu que d'autres modèles puissent également rendre compte des phénomènes observés.

L'importance du rôle de la flavine dans la fonction catalytique a été reconnue depuis longtemps par les observations d'une corrélation entre la libération partielle de celle-ci et les pertes d'activité de l'enzyme sous l'effet de divers facteurs ou réactifs ; les différents auteurs ont toujours insisté sur le caractère irréversible de ces phénomènes [1, 5, 6, 7, 8]. Cependant, des notes préliminaires relatives à deux séries de travaux indépendants entrepris par MORTON d'une part [9] et BAUDRAS d'autre part [10], mettaient en évidence la possibilité d'obtenir une dissociation réversible de la flavine prosthétique. Dans les deux cas, la séparation était obtenue par une variante de la méthode classique de WARBURG et CHRISTIAN [11] qui consiste en une précipitation de l'apoenzyme par le sulfate d'ammonium en milieu acide. L'apoenzyme ainsi obtenu par MORTON semblait peu réactivable dans les conditions où les tests d'activité étaient faits ; les activités spécifiques obtenues après incubation de l'apoenzyme avec le FMN étaient de l'ordre de 1 p. 100 de celle de l'enzyme natif pour la réduction du ferricytochrome c et 12 p. 100 pour la réduction du ferricyanure. L'apoenzyme préparé au cours de nos premières expériences montrait, en présence de concentrations saturantes de flavine, des taux de réactivation beaucoup plus importants (50 p. 100 environ de l'activité initiale et ceci quel que soit l'accepteur) [10]. Les caractères principaux de cette réactivation étaient les suivants : (a) rapidité, (b) spécificité du FMN, (c) concentration de FMN donnant la demi-réactivation égale à 2 μ M en milieu phosphate 66 mM (accepteur ferricyanure).

Nous décrivons ci-dessous les résultats détaillés concernant les propriétés physicochimiques et enzymatiques de l'Apo-L-LDH (apoenzyme sans flavine = hémoprotéine) destinés à mettre en évidence le rôle de la flavine. *Nous montrerons que le FMN prosthétique est essentiel pour l'activité enzymatique et pour le transfert des électrons provenant du L-lactate au groupe prosthétique cytochromique de la L-LDH.*

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

1°) L-lactico-déshydrogénase (L-LDH) :

a) Préparation :

La L-LDH est préparée essentiellement par la technique d'APPLEBY et MORTON [12] à partir de la levure de boulangerie commerciale Springer. Certains détails ayant été modifiés, nous décrivons ci-dessous le protocole expérimental exact.

Des pains de levure fraîche sont dissociés à la main en petits fragments qui sont mis à sécher à 30° pendant quatre jours. Cette levure sèche est réduite en poudre très fine dans un broyeur rotatif à galets de porcelaine ; ce broyage est effectué à la température de la pièce et dure 48 heures. Chaque préparation utilise 2 à 2,5 kg de cette poudre de levure qui peut être conservée pendant quelques semaines à la chambre froide sans inconvénients.

Les premières phases de la préparation de l'enzyme : extraction par autolyse après traitement par le n-butanol, précipitations successives en milieu acétonique 20 et 30 p. 100 puis redissolution de la L-LDH par suspension du précipité 30 p. 100 dans le mélange DL-lactate 0,12 M + acétone 25 p. 100, ont été faites exactement selon APPLEBY et MORTON [12]. Cette dernière solution qui contient l'enzyme est alors précipitée par l'acétone 30-35 p. 100 sans fractionnement intermédiaire. Le précipité acétonique final (30-35 p. 100) prend la consistance d'une huile épaisse par réchauffement vers zéro degré et peut alors être versé directement dans le sac de cellophane et dialysé contre la solution diluée de lactate qui provoque la cristallisation. En évitant ainsi de diluer l'enzyme par dissolution de ce précipité, comme dans la méthode originale, on favorise la cristallisation ultérieure.

Le rendement moyen de nos préparations atteint 20 à 30 mg de L-LDH cristallisée par kg de levure sèche, soit une valeur comparable à celle des préparations d'APPLEBY et MORTON. Dans les cas favorables

TABLEAU I.
*Caractères comparés des échantillons de L-LDH
préparés dans plusieurs laboratoires.*

	g. protéines pour 1 hème	FMN/ HEME	S _{20,w} L-LDH réduite	- SH/HEME	Activité molaire sec ⁻¹
R. K. MORTON et al. [3,13]	78 200 * ¹	1,0	9,17	4 à 6 (PCMS)	230 ± 20 (25°)
J. W. HINKSON [14] et H. R. MAHLER	75 000 * ²	1,0	8,9	7 ± 1 (PCMB)	160 (20°)
M. RIPPA [45]	113 600 * ³	0,93	—	—	285 (25°)
A. BAUDRAS (ce travail)	77 600 * ⁴ ± 1 750	1,05 ± 0,10	8,95 ± 0,15	6 ± 0,5 * ⁵ Ag (Tris) ₂ ⁺	250 à 300 (30°)

(1*) Calculé à partir du P.M. de l'unité DNA protéine 83.000 en corrigeant de la quantité de DNA (6 p. 100).

(2*) Protéines par Folin.

(3*) Recalculé à partir des données de l'auteur (activité molaire par hème et activité spécifique).

(4*) Protéines par Folin étalonné avec la β-lactoglobuline.

(5*) Dosage ampérométrique par AgNO₃, dans un tampon Tris/Nitrate, selon la technique de BENESCH.

où les pertes d'enzyme ont été très faibles au cours des fractionnements par l'acétone, on peut obtenir jusqu'à 50 mg de cristaux par kg de levure sèche.

Depuis quelques mois, la L-LDH est préparée à partir de la levure sèche de Springer (« Springa »), commercialisée récemment ; les rendements en L-LDH sont au moins aussi bons que ceux des préparations antérieures.

Les échantillons de L-LDH utilisés dans notre travail ont été cristallisés une seule fois, sauf mention contraire ; le Tableau I met en évidence l'identité des propriétés suivantes avec celles des échantillons cristallisés étudiés dans plusieurs laboratoires : activité molaire, masse protéique par hème, valeur de $S_{20,w}^0$, nombre de moles de flavine et nombre de groupes sulfhydryles titrables par mole d'hème. Il en est de même pour les caractéristiques du spectre d'absorption de la forme réduite de l'enzyme (cf. ci-dessous).

b) Propriétés spectrales :

Dans le Tableau II, nous comparons les propriétés spectrales de quelques échantillons de notre L-LDH, à pH neutre, avec celles de l'enzyme recristallisé de MORTON et al. [3]. Les extinctions molaires sont calculées sur la base de la valeur donnée par ces auteurs pour l'extinction molaire de la bande γ du constituant cytochromique de l'enzyme réduit.

Les positions en longueur d'onde des pics sont identiques mais, par contre, quelques écarts systématiques dans les valeurs des extinctions molaires sont à signaler. Les plus significatives (Tableau II) concernent la L-LDH oxydée : (a) nous constatons que l'extinction de la bande **UV** de l'enzyme oxydé est toujours inférieure à celle de l'enzyme réduit d'environ 6 p. 100, fait jamais signalé à notre connaissance ; (b) nous trouvons une valeur plus élevée que les auteurs cités [3], d'environ 18 p. 100, pour l'extinction de la bande γ du cytochrome à l'état oxydé ; RIPPÀ [15] avait observé également cette différence pour ses préparations qui, comme les nôtres, présentent une valeur du rapport $E_{\gamma_{red}}/E_{\gamma_{ox}}$ égale à $1,42 \pm 0,04$ au lieu de 1,70 pour celles de MORTON et al. Cette dernière différence ne tient pas à une imperfection de l'état de réduction ou d'oxydation de nos échantillons : l'addition d'hydro-sulfite ou de ferricyanure ne modifie en rien les extinctions des bandes cytochromiques des solutions respectivement réduites par le lactate et oxydées par l'air. Une explication qui reste possible serait que le traitement utilisé par APPLEBY et MORTON [5] pour oxyder leurs échantillons (oxydation par le ferricyanure suivie d'une dialyse) entraîne une modification de l'extinction de la bande γ . Il est remarquable, à cet égard, de constater que dans un article récent, MORTON et SHEPLEY [17] donnent une valeur plus élevée pour l'extinction molaire de la bande γ du ferricytochrome ($160 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ environ d'après leur spectre au lieu de $137 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ dans les publications antérieures). Par

TABLEAU II.

Caractéristiques spectrales de préparations cristallisées de L-LDH.

Bandes		α		β		γ		δ		U. V.†	
		ox.	red.	ox.	red.	ox.	red.	ox.	red.	ox.	red.
L-LDH recristallisée MORRISON et al. [3]	$\lambda_{\text{max.}} (\text{m}\mu)$ $\epsilon (\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1})$	560 10	556,5 38,8	530 14,0	528 18,6	412 137	423 (232)	359 47,6	330 52,2	265 198	265 199
L-LDH cristallisée 1 fois (1*) 20° - Air libre-CARY 14	$\lambda_{\text{max.}} (\text{m}\mu)$ $\epsilon (\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1})$	560 9,6	557 37,6	530 12,1	528 16,5	414 163	424 (232)	360-65 42,2	330 47,1	266 199	264 216
L-LDH cristallisée 2 fois (1*) 20° - Air libre-JOBIN	$\lambda_{\text{max.}} (\text{m}\mu)$ $\epsilon (\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1})$	560 11,7	557 38,7	532 14,2	527 19,4	413,5 164	424 (232)	360 41,8	328 49,0	265 173	265 184
L-LDH cristallisée 2 fois (1*) 20° - Sous azote après dégazage. CARY 14	$\lambda_{\text{max.}} (\text{m}\mu)$ $\epsilon (\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1})$	560 11,9	557 (38,8)	532 14,2	528 19,2	—	—	—	—	—	—
L-LDH cristallisée 1 fois par rapport au pyridine-hémochromogène (2*)	$\lambda_{\text{max.}} (\text{m}\mu)$ $\epsilon (\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1})$	—	—	—	—	413,5 171	424 243	—	—	—	—

(1*) Valeurs déterminées par les rapports des extinctions à celle du maximum γ réduit pris égal à : 232 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ selon MORRISON et al. [3].

(2*) Valeurs déterminées par le rapport des extinctions à la concentration d'hème mesurée par la méthode de l'hémochromogène pyridinique [16].

conséquent, nous considérons que notre valeur de l'extinction molaire du ferricytochrome à 414 m μ (163 ± 5 mM⁻¹cm⁻¹) est exacte.

En ce qui concerne l'enzyme réduit, en présence de lactate, les extinctions relatives aux différentes bandes ne montrent pas de différences significatives par rapport à celles des préparations de MORTON et al..

Quelques déterminations préliminaires des valeurs obtenues des extinctions par rapport à la concentration d'hème mesurée par la méthode de l'hémochromogène pyridinique [16] sont en excellent accord avec les valeurs calculées par rapport à l'extinction de la bande γ du cytochrome réduit adoptée de MORTON et al., ce qui justifie l'emploi de cette valeur comme référence.

2°) Apo—L-lactodéshydrogénase (Apo—L-LDH) :

L'Apo—L-LDH est obtenue en séparant la flavine par une méthode analogue à celle utilisée par WARBURG et CHRISTIAN pour l'ancien ferment jaune. Une solution fraîche de L-LDH (5 à 10 mg/ml) dans 4 ml de tampon phosphate 0,1 M, EDTA 20 μ M pH 7,2 est additionnée de sulfate d'ammonium jusqu'à 35 p. 100 environ de saturation et refroidie vers -10° . On ajoute goutte à goutte avec agitation vigoureuse 0,6 ml d'une solution de HCl 2 N, le pH du milieu est alors environ 2, puis le complément de sulfate d'ammonium pour assurer la saturation. A l'issue de cette opération qui dure 4 à 5 minutes, la L-LDH traitée est centrifugée à grande vitesse à -15° pendant 5 minutes. On sépare le surnageant qui contient la plus grande partie de la flavine du culot hémoprotéique.

a) Apo—L-LDH_{brute} :

Solution obtenue par dissolution du culot hémoprotéique dans 1 ml de tampon phosphate 0,1 M, EDTA 20 μ M pH 7,4, à 0° . Cette solution est le plus souvent limpide, sinon elle est centrifugée à 0° pour éliminer les traces de matériel insoluble. Ces solutions contiennent du sulfate d'ammonium et un peu de flavine libre (cf. Résultats expérimentaux : II, 1°, a).

b) Apo—L-LDH_{sephadex} :

Solution précédente passée sur une colonne de Sephadex G 25 (10 $\times$ 150 mm) équilibrée avec le tampon phosphate utilisé pour dissoudre l'Apo—L-LDH et maintenue à la chambre froide à 4° . Au cours de cette chromatographie, l'hémoprotéine se sépare du FMN contaminant qui apparaît comme une zone distincte, et du sulfate d'ammonium. On élimine les fractions de tête et de queue plus diluées pour ne conserver que la partie centrale de la bande cytochromique.

3°) Substrat, accepteurs, flavines :

Le substrat employé dans les tests d'activité enzymatique est une solution de lactate de sodium préparée à partir de l'acide lactique RP délactonisé par chauffage (taux d'isomère L- environ 70 p. 100).

Le sel de sodium de l'isomère L- de l'acide lactique est obtenu en échangeant le cation d'une solution de L-lactate de calcium (California Corp. for Biochem. Research) à l'aide de phosphate trisodique. Ces solutions sont dosées enzymatiquement par la méthode de LABEYRIE et al. [18].

Les accepteurs d'électrons utilisés sont le ferrieyanure de potassium (RP Prolabo) et le ferricytochrome c du cœur de cheval (Sigma Type II).

Les solutions de riboflavine et de FMN (Hoffman La Roche) et de FAD exempt de FMN (obtenu par dénaturation thermique de la D-aminoacide oxydase recrystallisée) sont conservées à l'obscurité et dosées spectrophotométriquement [19].

4°) Mesure des concentrations d'enzyme :

Les concentrations d'enzyme sont mesurées de façon standard par le dosage spectrophotométrique du constituant cytochromique à l'état réduit. On mesure l'extinction de l'enzyme en solution dans le tampon phosphate 0,1 M, EDTA 20 μ M pH 7,2-7,4 dans une cuve de trajet optique 1 cm (volume 3 ml). Selon la concentration des solutions, le dosage est effectué en utilisant l'extinction des bandes α ou γ dont les extinctions molaires (par rapport à l'hème) ont été déterminées avec beaucoup de précision par APPLEBY et MORTON [3, 5] pour la L-LDH plusieurs fois recrystallisée ; soit (Tableau II) : bande α (557 $m\mu$), $\epsilon = 38,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et bande γ (424 $m\mu$), $\epsilon = 232 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Le choix de ces valeurs a été justifié ci-dessus. On s'assure toujours, en faisant varier la longueur d'onde, que l'extinction est bien mesurée au maximum du pic et que, d'autre part, la réduction est bien complète par le lactate (c'est-à-dire que l'addition d'hydrosulfite n'augmente pas l'extinction).

Dans quelques expériences particulières, le contenu de protéines de l'enzyme a été déterminé par la méthode de LOWRY et al. [20] avec un réactif de FOLIN préparé au laboratoire [21]. Pour chaque série de dosages, on établit une courbe d'étalonnage avec une solution de β -lactoglobuline plusieurs fois recrystallisée dont la concentration exacte est déterminée par dosage spectrophotométrique à 280 $m\mu$: $1/\epsilon = 1,04$ pour 1 mg/ml [22].

5°) Mesure de l'activité enzymatique :

a) Essai standard de la L-LDH :

L'activité enzymatique est mesurée dans les conditions standard chaque fois que l'on veut définir l'état fonctionnel de la L-LDH. On mesure la vitesse de réduction du ferrieyanure de potassium par le lactate en présence d'une quantité définie de L-LDH en suivant au cours du temps la variation d'extinction à 420 $m\mu$ du mélange réactionnel suivant contenu dans une cuve (trajet optique 1 cm, volume de la solution 3 ml) : tampon phosphate 66 mM, EDTA 13 μ M, DL-lactate 16,6 mM, ferrieyanure 0,66 mM ; pH 7,3. La réaction est déclenchée par addition de l'enzyme dans la cuve préalablement équilibrée à 30° dans

le compartiment thermostaté du spectrophotomètre Beckman DU. L'extinction diminue linéairement au cours du temps (réaction d'ordre zéro) ; la pente mesure l'activité.

b) *Essai standard de l'Apo—L-LDH :*

« *Activité résiduelle* » : Une aliquote de l'Apo—L-LDH (brute ou passée sur Sephadex) est ajoutée à une cuve contenant : tampon phosphate 66 mM, EDTA 13 μ M, DL-lactate 66 mM, ferricyanure 0,66 mM ; pH 7,3 et 30° ; volume final 3 ml. L'extinction E ne varie pas linéairement au cours du temps, mais la représentation graphique $\log [(\Delta E)_{\Delta t = \text{cte}}] = f(t)$ est linéaire (réaction du premier ordre). La vitesse initiale obtenue par l'extrapolation à $t = 0$ de cette droite mesure l'activité résiduelle.

« *Activité reconstituée* » : Une aliquote d'Apo—L-LDH (brute ou passée sur Sephadex) est ajoutée dans une cuve contenant le même milieu que dans l'essai « *Activité résiduelle* » avec, en supplément, du FMN à la concentration 20 μ M. Comme on le verra dans la partie consacrée aux résultats expérimentaux, l'Apo—L-LDH se combine très rapidement avec le FMN et la concentration de FMN 20 μ M est saturante dans le milieu utilisé. L'extinction du ferricyanure à 420 m μ diminue linéairement au cours du temps, comme pour la L-LDH non traitée, la pente de cette droite mesure l'activité de la L-LDH reconstituée.

c) *Essais avec le ferricytochrome c :*

L'activité de la L-LDH est inhibée par les forces ioniques élevées lorsque l'accepteur est le ferricytochrome c [23]. Ces essais sont donc effectués dans le mélange réactionnel suivant : tampon phosphate 6,6 mM (au lieu de 66 mM), EDTA 13 μ M, DL-lactate 16,6 mM, ferricytochrome c 30 μ M ; pH 7,3 et 30°. La concentration de ferricytochrome c utilisée dans ces essais n'étant pas saturante pour la L-LDH, les vitesses initiales (extrapolées au temps zéro) ont été utilisées pour calculer l'activité relativement à cet accepteur.

Dans ce travail, seul le cytochrome c du cœur de cheval a été utilisé ; cet accepteur n'est évidemment pas physiologique. A ce propos, il convient de rappeler que les deux iso-cytochromes c de la levure sont réduits avec la même vitesse que le cytochrome c du cœur de cheval (à saturation en cytochrome c), mais que, comme l'ont observé SŁONIMSKI et al. [in 16], l'affinité de la L-LDH est plus grande pour les cytochromes c de levure que pour celui du cœur de cheval.

d) *Définition de l'activité molaire :*

Un point délicat de nomenclature s'est posé quant à la définition de l'activité catalytique de la L-LDH. En effet, cet enzyme d'oxydoréduction assure le transfert de deux électrons provenant du L-lactate à des accepteurs soit mono- soit di-électroniques, par l'intermédiaire de deux groupes prosthétiques : le FMN (di-électronique) et le constituant cytochromique (mono-électronique),

Les possibilités offertes par la nomenclature officielle (Report of the Commission on Enzymes of the I.U.B., 1961) ne nous donnant pas entière satisfaction, nous sommes convenus d'employer le nombre d'électron-équivalents transférés comme base de calcul. D'autre part, l'activité de la L-LDH étant très élevée, l'utilisation des minutes comme base de temps conduit à la manipulation fastidieuse de nombres de quatre chiffres ; nous avons donc adopté la seconde comme unité de temps.

Ainsi donc, nous appellerons « *Activité Molaire* » de la L-LDH, l'*activité définie par le nombre d'électron-équivalents transférés en une seconde à l'accepteur par une quantité d'enzyme contenant une mole d'hème du constituant cytochromique (dosé spectrophotométriquement)*.

Le nombre d'électron-équivalents transférés est obtenu à partir de la quantité d'accepteur réduite, calculée en utilisant les extinctions différentielles suivantes :

(1) Ferricyanure : $\epsilon_{\text{ox}} - \epsilon_{\text{red}} = 1,04 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 420 m μ .

(2) Cytochrome c : $\epsilon_{\text{red}} - \epsilon_{\text{ox}} = 21,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 550 m μ [36].

Ainsi définie, l'« *Activité Molaire* » a la dimension de l'inverse d'un temps (sec.⁻¹). Elle présente l'avantage de pouvoir être directement comparée aux valeurs des constantes de vitesse de réduction des groupes prosthétiques eux-mêmes exprimées dans la même unité.

Dans les travaux antérieurs, plusieurs définitions ont été utilisées pour exprimer l'activité catalytique de la L-LDH cristallisée. Les facteurs de conversion entre ces diverses unités et l'*Activité Molaire* définie ci-dessus sont les suivants :

(1) Activité spécifique utilisée par MORTON et al. [12] : *nombre X de micromoles de ferricyanure réduites par heure et par mg de poids sec* :

$$\text{« Activité Molaire »} \equiv X \times 2,28 \cdot 10^{-2}.$$

(base de calcul : une mole d'hème pour 82.300 g de L-LDH)

(2) RIPPA [15] a employé le terme « Turn-over Number » : (TN) = *micromoles de ferricyanure réduites par minute par une quantité d'enzyme contenant une micromole d'hème* :

$$\text{« Activité Molaire »} \equiv (\text{TN}) \times \frac{1}{60}.$$

(3) Enfin, MORTON et STURTEVANT [34] ont utilisé récemment la même définition que RIPPA *mais avec la seconde comme unité de temps*. Cette dernière définition est identique à notre « *Activité Molaire* » ; toutefois, nous avons rejeté le terme (TN) en raison des multiples sens qui lui ont été donnés dans le passé.

6°) *Ultracentrifugation analytique.*

Des échantillons de L-LDH ont été étudiés par la Station Centrale d'Ultracentrifugation du C.N.R.S. Les solutions de L-LDH utilisées étaient préparées par dissolution de cristaux dans le tampon suivant :

phosphate 0,1 M, EDTA 20 μ M, DL-lactate 50 mM ; pH 7,3 ; viscosité par rapport à l'eau 1,01. Cette solution, après centrifugation pour éliminer les traces de matériel insoluble (10.000 RPM pendant 10 minutes, à 0°), subit les dilutions convenables dans ce même milieu.

Les solutions d'Apo—L-LDH soumises à l'ultracentrifugation sont obtenues par dissolution puis dilutions dans le milieu ci-dessus d'échantillons d'Apo—L-LDH_{brute} ; elles contiennent par conséquent du sulfate d'ammonium (cf Texte).

Les solutions de L-LDH reconstituée sont obtenues par addition de FMN à une solution d'Apo—L-LDH_{brute} (FMN/Hème = 6) dans le milieu décrit ci-dessus.

Les valeurs de $S_{20,w}^0$ sont obtenues par l'extrapolation à concentration nulle de protéine des valeurs de S_{20} correspondant à une série de trois concentrations d'enzyme ou d'apoenzyme ; la correction de viscosité du tampon est négligeable.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

I. — Détachement spontané du FMN et inactivation de la L-LDH par vieillissement.

1°) Stabilité des solutions fraîches de L-LDH.

Les solutions de L-LDH préparées par dissolution de cristaux fraîchement récoltés, oxydées par l'oxygène de l'air ou réduites par le

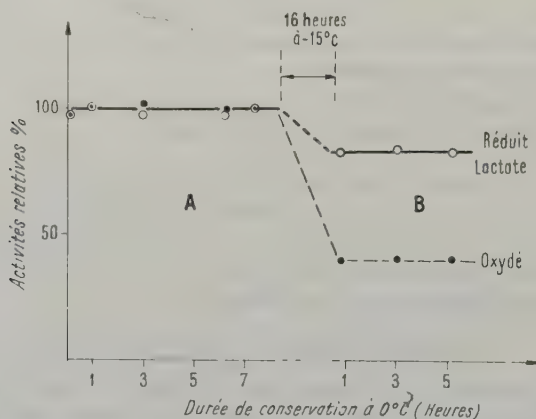


FIG. 1. — Stabilité des solutions de L-LDH à 0°.

Après dissolution de cristaux frais de L-LDH dans le tampon phosphate 0,1 M, EDTA 20 μ M, pH 7,2, à 0°, et agitation à l'air jusqu'à oxydation, on prépare deux solutions équivalentes (1,14 μ M) : la première sans lactate, la seconde contenant DL-lactate 50 mM.

Ces deux solutions sont placées à 0° pendant huit heures (A), puis congelées à -15° pendant seize heures, décongelées et placées à nouveau à 0° (B). On suit, par prélèvement d'aliquotes dont l'activité est mesurée dans les conditions standard (cf Techniques), la variation d'activité au cours du temps.

lactate, peuvent être conservées plusieurs heures à 0° sans inactivation notable. Par contre le processus de congélation suivi de décongélation entraîne une inactivation importante de ces mêmes solutions. Le substrat protège partiellement la L-LDH contre cette inactivation (Figure 1).

2°) *Propriétés de la L-LDH partiellement inactivée par vieillissement.*

Lorsque les solutions concentrées de L-LDH oxydée dans le tampon phosphate sont conservées pendant de longues durées, même sous atmosphère d'azote et à -15° , on note une inactivation progressive qui est accompagné de modifications des propriétés de l'enzyme.

Ainsi, les cinétiques de réduction du ferricyanure par le lactate sont modifiées ; en présence de L-LDH vieilli, la vitesse de la réaction diminue au cours du temps pendant la mesure (Figure 2), alors qu'elle

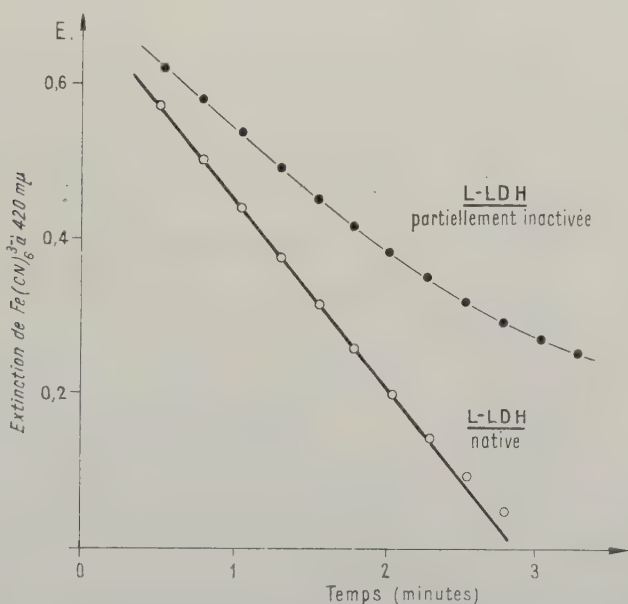


FIG. 2. — *Cinétiques de réduction du ferricyanure par le lactate en présence de L-LDH, native ou partiellement inactivée.*

Mélange réactionnel : tampon phosphate 66 mM, EDTA 13 μ M, ferricyanure, 0,66 mM, DL-lactate 16,6 mM, pH 7,3, 30° ; aliquotes de L-LDH ajoutées au temps zéro.

L-LDH native : solution fraîche de cristaux venant d'être récoltés.

L-LDH partiellement inactivée : échantillon conservé en solution concentrée oxydée, à -15° , sous azote pendant 15 semaines ; FMN fixé sur la L-LDH : 35 pour cent (cf Figure 4).

reste constante pour la L-LDH fraîche. La réaction catalysée par la L-LDH vieilli est du premier ordre dans le temps puisque l'analyse des cinétiques selon la représentation $\log (\Delta E)_{15 \text{ sec.}} = f(t)$ donne une

droite (Figure 3). Cette modification de l'ordre apparent de la réaction par vieillissement de la L-LDH ne résulte pas d'une diminution de l'affinité de l'enzyme vieilli pour le ferricyanure ; en effet, les vitesses extrapolées au temps zéro (cf Figure 3) sont indépendantes de la concentration initiale de cet accepteur dans le mélange réactionnel (entre 0,17 et 0,66 mM).

On peut expliquer cette modification par une inactivation progressive de l'enzyme dans les cuves de mesure ; cette inactivation est liée à une dissociation, en partie réversible, de la flavine. En effet, l'addition de FMN au mélange réactionnel entraîne à la fois une stimulation de l'activité et une diminution de la vitesse de cette inactivation (Figure 3). Ces résultats confirment une observation antérieure de SLO-

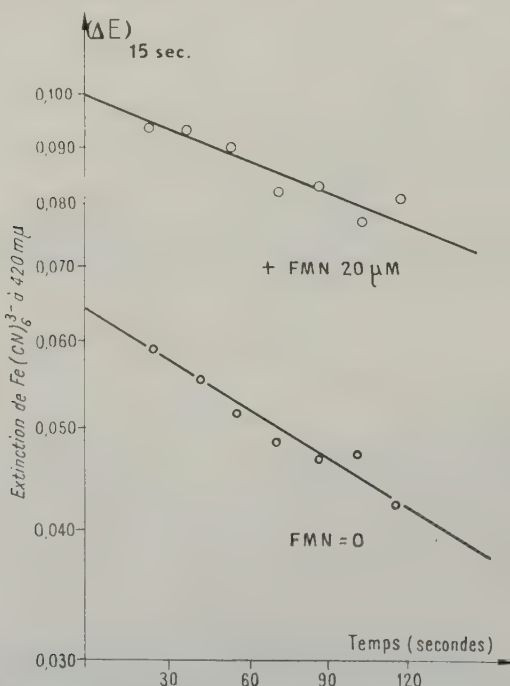


FIG. 3. — Stimulation par le FMN de l'activité de la L-LDH partiellement inactivée.

Echantillon de L-LDH de la série étudiée Figure 4, qui a été conservé pendant trois semaines à -15° . Activité molaire par hème : 132 sec.⁻¹, et par flavine : 210 sec.⁻¹ ; taux de flavine fixée : 63 pour cent.

Mesures d'activité dans le mélange réactionnel décrit Figure 4, contenant ou non le FMN à la concentration 20 μM.

Après addition d'une même prise d'enzyme, on suit au cours du temps les variations d'extinction (E) à 420 mμ. On a porté, en fonction du temps, les variations d'extinction pendant des intervalles de temps successifs égaux de 15 secondes, $(\Delta E)_{15 \text{ sec.}}$, sur une échelle logarithmique afin de montrer que la réduction du ferricyanure est du premier ordre dans le temps. La vitesse initiale est mesurée par l'ordonnée à l'origine.

NIMSKI et TYSAROWSKI [24] sur des préparations d'enzyme purifiées mais non cristallisées.

En outre, l'activité molaire de ces échantillons, extrapolée à saturation en flavine, est sensiblement plus faible que celle des solutions fraîches de L-LDH (Figure 4) soit 230 sec^{-1} au lieu de 300 sec^{-1} (Tableau I).

3°) Dissociation de la flavine et inactivation.

Tous les auteurs ont observé qualitativement un détachement de la flavine prosthétique qui accompagne divers processus d'inactivation

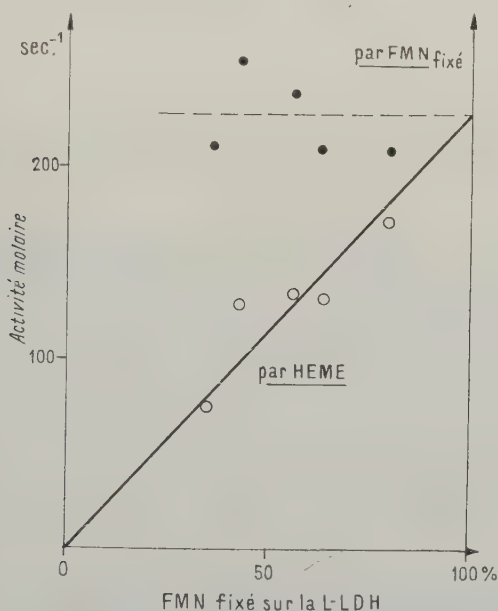


FIG. 4. — Corrélation entre inactivation et dissociation irréversible du FMN prosthétique au cours du vieillissement de la L-LDH à -15° .

Des solutions de L-LDH oxydée, dans le tampon (phosphate 0,1 M, EDTA 20 μM , pH 7,2), ont été conservées congelées à -15° , sous azote, pendant des durées variant de 10 jours à 4 mois.

Le taux de FMN fixé à l'enzyme est mesuré fluorimétriquement selon [28] et obtenu par différence entre $(\text{FMN})_{\text{total}}$ (fluorescence en présence de nitrate d'argent) et (FMN) dissocié irréversiblement (fluorescence en présence de lactate). Le taux de FMN fixé est exprimé par rapport à l'hème du constituant cytochromique dosé spectrophotométriquement.

L'activité enzymatique des solutions de L-LDH est mesurée dans le milieu réactionnel suivant : tampon phosphate 66 mM, EDTA 13 μM , ferricyanure 0,66 mM, DL-lactate 30 mM FMN 20 μM , pH 7,3, 30° . Les activités molaires (sec^{-1}) sont exprimées en calculant le nombre d'électron-équivalents transférés à l'accepteur par seconde en présence d'une quantité d'enzyme contenant soit une mole d'hème du constituant cytochromique (—o—o—), soit une mole de FMN fixé sur la L-LDH (--o---o--).

Remarque : la L-LDH conservée ayant une faible affinité pour le FMN (Figure 3 et [28]), il est nécessaire, pour connaître les concentrations totales d'enzyme actif, d'opérer les mesures d'activité en présence de FMN saturant.

[1, 5, 6, 8]. Dans la Figure 4, nous présentons la relation directe qui existe entre ces phénomènes lors de l'inactivation par conservation prolongée de préparations différentes d'enzyme. Le fait que la droite représentative des variations de l'activité molaire en fonction du taux de FMN fixé passe par l'origine prouve que ce dernier est essentiel pour l'activité catalytique.

II. — *Séparation du FMN en milieu acide ; étude de l'Apo—L-LDH formée.*

1°) *Etude des propriétés physico-chimiques de la L-LDH et de l'Apo—L-LDH.*

a. *Bilans.*

Le détachement de la flavine est obtenu en précipitant la L-LDH par le sulfate d'ammonium (pH voisin de 2) à basse température (— 10° à — 15°). Par centrifugation et décantation, on sépare le culot (hémoprotéine) du surnageant (flavine).

Le surnageant contient la plus grande partie de la flavine (70 à 90 p. 100) comme le montrent les Tableaux III et IV, ainsi qu'une partie du polydésoxyribonucléotide [1, 25, 26] qui s'est trouvée détachée de la L-LDH par le sulfate d'ammonium (figure 5 spectre c). Nous avons extrait la flavine du surnageant par adsorption sur une colonne de Séphadex G25 suivie d'une élution par l'eau bidistillée ; concentrée par extraction au p-crésol puis par l'eau en présence d'éther, elle se comporte comme les échantillons authentiques de FMN au cours de chromatographies descendantes sur papier Whatman N° 1 (solvant : phosphate disodique 5 p. 100 selon [27]).

Le culot, intégralement soluble dans le tampon phosphate à neutralité, contient la totalité de l'hémoprotéine, comme le montre le bilan de l'extinction des produits réduits à 424 m μ . La quantité de protéine associée à une mole d'hème du constituant cytochromique est, comme pour la L-LDH initiale, environ 76.000 g (Tableau III).

L'hémoprotéine ainsi préparée est contaminée par une partie de la flavine initiale. La proportion de flavine contaminante est généralement de l'ordre de 10 p. 100, et s'élève parfois à 25 p. 100 environ lorsqu'on part de cristaux de L-LDH fraîchement récoltés (Tableaux III et IV).

La flavine contaminante n'est pas totalement liée à la protéine ; en effet, les solutions présentent la fluorescence typique des flavines libres contrairement aux solutions de L-LDH non traitée [1] ou reconstituée [28]. La quasi totalité de la flavine aussi bien que le sulfate d'ammonium présents dans ces solutions peuvent être éliminés par simple passage sur une colonne de Sephadex G25.

TABLEAU III.

*Dissociation de la flavine de la L-LDH
par le sulfate d'ammonium acide : Bilans de composition.*

	$E_{424} \text{ m}\mu$ $\times$ volume (1)	HEME $\text{m}\mu$ moles (2)	FMN $\text{m}\mu$ moles (3)	g. Protéine pour 1 Hème (4)	$S_{20, w}^0$ (5)
L-LDH traitée	121,3	523	(523)	77 600 $\pm$ 1 750	8,95 (9,2 [13])
Apo-L-LDH _{brute}	118,6	524	142	73 800 $\pm$ 500	7,5 (7,9 [9])
Apo-L-LDH _{Sephadex}	110	488	traces	74 600 $\pm$ 1 100	—
L-LDH reconstituée cristallisée	—	176	188	78 400 $\pm$ 1 350	—

Produits analysés :

La L-LDH (cristallisée une fois) est soumise au traitement au sulfate d'ammonium acide à pH 2,6. Le culot d'hémoprotéine dissous dans le tampon phosphate 0,1M, EDTA 20 μ M pH 7,4 et centrifugé = Apo-L-LDH_{Brute}.

Une partie de cette solution (116 $\text{m}\mu$ moles d'hème) passée sur une colonne de Séphadex G25 (12 $\times$ 130 mm) équilibrée avec le même tampon à 4° constitue l'Apo-L-LDH_{Sephadex}. Les données relatives à cette solution sont recalculées pour la totalité de l'Apo-L-LDH_{Brute} afin de faciliter leur comparaison avec les précédentes.

Le reste de la solution d'Apo-L-LDH_{Brute} (358 $\text{m}\mu$ moles) est additionné de FMN en quantité équimoléculaire et dialysé 48 heures dans les conditions décrites Tableau V. Les cristaux de L-LDH reconstituée (49,3 p. 100 de l'hémoprotéine mise en dialyse) sont lavés dans une solution identique à celle de la dialyse exempte de FMN avant d'être dissous dans le tampon ci-dessus.

Déterminations :

(1) Extinction du cytochrome réduit à 424 $\text{m}\mu$ (cf techniques) multipliée par le volume de la solution analysée. L'Apo-L-LDH_{Sephadex} a été réduite par l'hydrosulfite ; l'Apo-L-LDH_{Brute} et la L-LDH par DL-lactate 25 mM.

(2) Quantité d'hème calculée d'après l'extinction des solutions réduites (424 $\text{m}\mu$) en utilisant les extinctions suivantes : L-LDH 232 $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Apo-L-LDH 226 $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (cf Figure 5).

(3) La quantité de FMN présente dans l'Apo-L-LDH_{brute} est obtenue en faisant la différence entre la quantité de FMN de la L-LDH initiale (FMN/Hème = 1,0) et la quantité de flavine détachée, contenue dans le surnageant du traitement acide, qui est dosée d'après l'extinction à 445 $\text{m}\mu$ (12,5 $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Le contenu de flavine de la L-LDH reconstituée cristallisée est mesuré fluorimétriquement selon [28] après dénaturation thermique.

(4) Protéines dosées par la méthode de Lowry et al. avec étalonnage par rapport à une solution de β -lactoglobuline.

(5) Déterminations effectuées à la Station Centrale d'Ultracentrifugation du C.N.R.S. (cf Techniques). Entre parenthèses : références concernant les valeurs obtenues dans d'autres laboratoires ; pour l'Apo-L-LDH de MORTON, la valeur S = 7,9 se rapporte à une seule concentration (1,3 mg/ml).

TABLEAU IV.

*Dissociation de la flavine de la L-LDH
par le sulfate d'ammonium acide : Bilans de l'activité enzymatique.*

L-LDH m μ moles d'hème (1)	FMN détaché m μ moles (2)	Activités Molaires (3)			
		L-LDH initiale	Apo-L-LDH brute	L-LDH reconstituée	Accepteur
460	333 (119)	175	19,7	76 (20)	[Fe (CN) ₆] ³⁻
		135	12,9	53	Cyt. c
336	276 (56)	125	27,2	74 (23,5)	[Fe (CN) ₆] ³⁻
		96	—	—	Cyt. c
123	100	194	12,7	106 (6)	[Fe (CN) ₆] ³⁻
		147	18,0	89	Cyt. c
284	266	300	31,3	172 (20)	[Fe (CN) ₆] ³⁻
		—	—	—	Cyt. c
104	88	252	20	106 (36)	[Fe (CN) ₆] ³⁻
		—	21,8	104	Cyt. c

Les résultats consignés dans ce tableau concernent cinq préparations différentes de L-LDH cristallisée une fois. Ces préparations ont été conservées pendant des durées variables (de quelques jours à quelques semaines) avant d'être utilisées ; leur activité molaire est par conséquent variable du fait de leur inactivation au cours de cette conservation.

(1) Les quantités de L-LDH traitées (exprimées en m μ moles d'hème du constituant cytochromique) et (2) les quantités de FMN détachées de la L-LDH par le traitement acide, sont déterminées spectrophotométriquement (cf Légende Tableau III).

Dans la colonne (2), les valeurs entre parenthèses représentent les quantités de flavine séparées de l'Apo-L-LDH_{brute} par chromatographie sur Sephadex G25, dosées fluorimétriquement selon [28]. La somme des quantités de FMN dissocié par le traitement acide et séparé de l'Apo-L-LDH_{brute} sur Sephadex, doit être égale à la quantité d'hème (FMN/Hème = 1).

(3) Les activités molaires (par hème), en sec.⁻¹, sont mesurées dans les conditions décrites dans la partie Techniques. Les valeurs entre parenthèse sont les concentrations de FMN (μ M) ajoutées dans les cuves de mesure de l'activité de la L-LDH reconstituée.

b. Spectres.

Les solutions obtenues par dissolution du culot hémoprotéique ont un spectre cytochromique identique à celui de la L-LDH initiale. En effet, comme le montre la Figure 5, les pics d'absorption du cytochrome ne présentent aucun déplacement décelable en longueur d'onde, et, d'autre part, le détachement de la flavine rend compte quantitative-

ment des différences d'extinction molaire entre l'Apo—L-LDH et l'enzyme de référence. Par conséquent, la présence de la flavine dans la

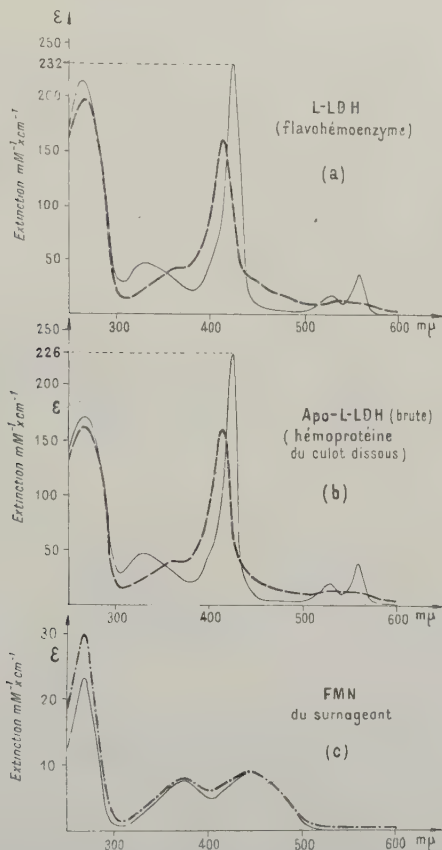


FIG. 5. — Comparaison du spectre de la L-LDH native avec ceux de l'Apo-L-LDH et du FMN séparés par dissociation en sulfate d'ammonium acide.

Une solution (volume 4,0 ml) de L-LDH (une fois cristallisée) est traitée par le sulfate d'ammonium à pH 2,6 (cf Techniques) ; le culot est redissous dans du tampon (phosphate 0,1 M, EDTA 20 μM , pH 7,2) pour donner la solution d'Apo-L-LDH_{brute}, volume final 4,0 ml.

Des aliquotes de ces deux solutions, après dilutions identiques dans le même tampon, sont spectrées à l'état oxydé (— — — — —), puis réduites par le lactate (— — — — —), à l'air libre ; l'addition d'hydrosulfite n'augmente pas l'extinction des bandes d'absorption des solutions réduites.

Le spectre du surnageant du traitement acide (Spectre c, trait continu) qui contient 72,5 p. 100 de la flavine de l'enzyme traité, est comparé à celui d'une solution de FMN commercial ayant la même extinction à 445 mμ (Spectre c, trait discontinu).

Spectrophotomètre Zeiss. Température 20°. Extinctions ($mM^{-1}cm^{-1}$) calculées par rapport à l'extinction de la L-LDH à 424 mμ (bande γ du cytochrome réduit) soit $\epsilon = 232 \text{ } mM^{-1}cm^{-1}$.

L-LDH n'exerce aucune influence sur les propriétés spectrales de l'hémo protéine.

c. *Ultra-centrifugation analytique.*

Les solutions de L-LDH préparées par dissolution des cristaux à l'air libre dans le tampon phosphate 0,1M, EDTA 20 μ M, DL-lactate 50 mM pH 7,2 présentent à l'ultracentrifugation analytique un constituant principal homogène qui se traduit par un pic d'apparence symétrique. MORTON et al. [3, 8] ont observé que leurs solutions de L-LDH réduite (enzyme plusieurs fois cristallisé) présentaient plusieurs constituants lourds après exposition à l'oxygène de l'air ; ils ont suggéré que cette agrégation résulte de la formation de ponts disulfures interchaînes. Dans nos expériences, bien que les solutions aient été exposées à l'air, il n'apparaît que des traces non estimables de constituants lourds ; nos échantillons semblent donc moins sensibles à l'oxygène que ceux de MORTON et al. La valeur du coefficient de sédimentation déterminée par extrapolation des valeurs de S_{20} pour différentes concentrations de L-LDH (Figure 6) est $S_{20,w}^0 = 8,95 \pm 0,15$.

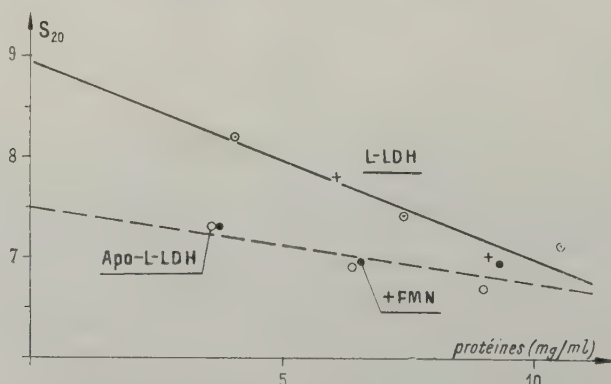


FIG. 6. — Détermination des coefficients de sédimentation de la L-LDH, de l'Apo-L-LDH et de la L-LDH reconstituée (Apo-L-LDH + FMN).

Station Centrale d'Ultracentrifugation du C.N.R.S. Spinco modèle E. Vitesse de régime 59.780 RPM.

L-LDH : deux préparations différentes cristallisées une fois (trait continu).

Apo-L-LDH : préparée selon la technique habituelle (Apo-L-LDH_{brute}, activité molaire en présence de FMN saturant : 112 sec.⁻¹) et L-LDH reconstituée : solution précédente + FMN dans le rapport FMN/ Hème = 6 (trait discontinu).

Les échantillons étudiés sont en solution dans un tampon phosphate additionné de DL-lactate (cf Techniques), de viscosité par rapport à l'eau : 1,01. On a représenté les variations de S_{20} en fonction des concentrations de protéine (cf Techniques).

L'Apo—L-LDH sédimente à l'ultra-centrifugation sous l'aspect d'un constituant principal qui n'est pas toujours homogène et dont le coeffi-

cient de sédimentation $S_{20,w}^0 = 7,5$ est significativement plus faible que celui de la L-LDH cristallisée (Figure 6). Il n'est pas possible actuellement de donner une explication définitive de cette observation. Le détachement, lors du traitement acide, d'une partie du polydésoxyribonucléotide (DNA) associé à la L-LDH ne suffit pas à expliquer cette diminution ($\approx 1,5$ S) de la valeur du coefficient de sédimentation. En effet, ARMSTRONG et al. [29] n'ont observé qu'une différence de 0,6 S entre les coefficients de sédimentation de la L-LDH avec DNA (« Type 1 » de MORTON et al., $S_{20,w}^0 = 9,17$) et de la L-LDH sans DNA (« Type 2 » de MORTON et al., $S_{20,w}^0 = 8,6$). Par contre, une modification de forme de la molécule de L-LDH, intervenant lors de la dissociation acide du FMN, pourrait rendre compte de la différence que nous avons observée, étant entendu que celle-ci est toutefois trop peu importante pour qu'une dissociation de la molécule en deux sous-unités puisse être prise en considération.

Nous avons déjà indiqué que l'Apo—L-LDH_{brute} utilisée dans ces expériences contient du sulfate d'ammonium. Toutefois, ce sel est dilué dans le tampon en même temps que la protéine lorsqu'on fait varier la concentration de cette dernière ; par conséquent, la présence du sulfate d'ammonium n'affecte pas la valeur de $S_{20,w}^0$ pour l'Apo—L-LDH et l'enzyme reconstitué. D'autre part, on s'attendrait à ce que la présence du sulfate d'ammonium augmente la pente de la droite $S_{20} = f$ (protéine) pour l'Apo—L-LDH et la L-LDH reconstituée ; on constate, au contraire, une diminution de pente importante par rapport à la droite relative à la L-LDH non traitée. Ce changement de pente est donc significatif ; il s'accorde également avec un changement de forme de la molécule protéique.

2°) Etude des propriétés enzymatiques.

a. Activité résiduelle, réactivation spécifique de l'Apo—L-LDH.

Lorsqu'on effectue la mesure de l'activité enzymatique résiduelle de l'Apo—L-LDH dans les conditions standard, on constate que la réduction du ferricyanure suit une cinétique du premier ordre dans le temps (la représentation graphique $\log(\Delta E)_{15 \text{ sec.}} = f(t)$ est linéaire) ; on exprime alors l'activité par la vitesse extrapolée au temps zéro. Par contre, la L-LDH non traitée aussi bien que la L-LDH reconstituée (Apo—L-LDH + FMN saturant) montrent des cinétiques de réduction du ferricyanure par le lactate qui sont d'ordre zéro dans le temps (Figure 7). Cette modification de l'ordre apparent de la réaction de réduction du ferricyanure traduit une diminution, progressive dans le temps, de la concentration du complexe actif Apo—L-LDH-FMN. Cette inactivation progressive pendant la mesure d'activité est due, pour une part, à une dissociation de flavine ; la dissociation du complexe actif Apo—L-LDH-FMN est provoquée par la dilution du mélange Apo—L-LDH plus FMN dans la cuve de mesure de l'activité, elle sera étudiée de façon détaillée ailleurs [33].

Nous montrerons dans le prochain paragraphe qu'en absence totale de FMN l'Apo—L-LDH est totalement inactive pour la réduction des accepteurs et que le constituant cytochromique de cette Apo—L-LDH n'est plus réductible par le lactate.

L'Apo—L-LDH (brute ou passée sur Sephadex) est très réactivable par le FMN ; en effet, lorsqu'on ajoute une prise d'Apo—L-LDH dans une cuve de mesure contenant le mélange réactionnel standard additionné de FMN, on observe une activation très rapide, l'activité maximum étant atteinte en quelques dizaines de secondes (Figure 7).

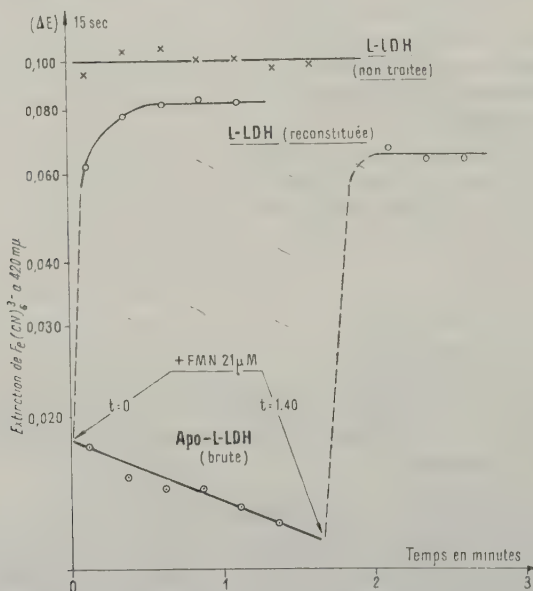


FIG. 7. — Cinétiques de réduction du ferricyanure par le lactate en présence de L-LDH non traitée, d'Apo-L-LDH et de L-LDH reconstituée.

Mélange réactionnel : tampon phosphate 66 mM, EDTA, 13 μM , ferricyanure 0,66 mM, DL-lactate 66 mM, FMN 21 μM ou zéro ajouté au temps indiqué ; pH 7,3, 30°.

La représentation graphique $\log [(\Delta E)_{15 \text{ sec}}]$ en fonction du temps donne une droite de pente nulle pour les réactions d'ordre zéro, de pente définie pour les réactions d'ordre un, l'ordonnée à l'origine étant égale à la vitesse initiale de la réaction.

A saturation en flavine, l'activité molaire de la L-LDH ainsi reconstituée est pratiquement identique lorsqu'on la mesure avec le ferricyanure ou le ferricytochrome c comme accepteurs, comme pour la L-LDH non traitée (Tableau IV). Par conséquent, les fonctions de transfert des électrons au ferricyanure et au cytochrome c sont restaurées solidaires lorsque le FMN se fixe sur l'Apo—L-LDH.

Le taux de réactivation obtenu peut atteindre 70 à 80 p. 100 dans les meilleures conditions, lorsque la séparation de la flavine a été effectuée sur des cristaux de L-LDH fraîchement récoltés (cf. Tableau V).

L'action du FMN est spécifique ; la riboflavine et le FAD exempt de FMN (préparé par dissociation de la D-amino-acide-oxydase recristallisée) ne donnent aucune réactivation (Figure 8). Les caractères précis de la resaturation de l'Apo-L-LDH par le FMN seront décrits dans un autre article [33].

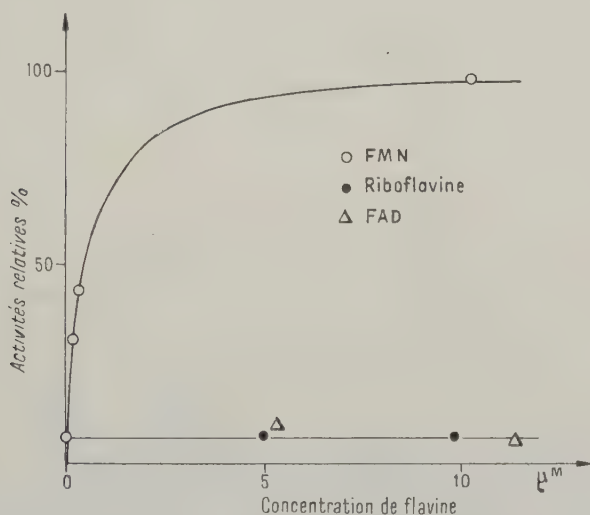


FIG. 8. — Effet spécifique du FMN dans la réactivation de l'Apo—L-LDH.

Les cuves spectrophotométriques contiennent le mélange réactionnel suivant : tampon Tris/Chlorure 50 mM, EDTA 20 μM , ferricyanure 0,66 mM, DL-lactate 66 mM, pH 7,3, 30°, auquel est ajouté le FMN, la riboflavine ou le FAD exempt de FMN, aux concentrations indiquées en abscisses. La réaction est déclenchée par addition d'une prise d'Apo—L-LDH_{brute}.

L'Apo—L-LDH est relativement stable, elle perd moins de 10 p. 100 de sa capacité de réactivation en cinq heures lorsqu'elle est conservée en solution concentrée (5 à 15 mg/ml) dans le tampon phosphate 0,1 M, EDTA 20 μM pH 7,2-7,3 à 0°. Ces solutions peuvent être conservées congelées à -15° , après décongélation on note une perte d'activité reconstituée de 20 à 30 p. 100. Par contre, les solutions diluées (0,1 mg/ml) s'inactivent très rapidement ; elles doivent donc toujours être préparées extemporanément. Les solutions d'Apo L-LDH_{sephadex} sont comparativement beaucoup plus instables que les solutions brutes.

b. Non réductibilité du constituant cytochromique de l'Apo—L-LDH par le lactate.

La réduction du cytochrome de l'Apo—L-LDH par le lactate s'effectue très rapidement et totalement lorsque celle-ci contient des quan-

tités notables de flavine ; c'est le cas pour l'Apo-L-DH_{brute}. Après élimination de la plus grande partie du FMN par passage sur une colonne de Sephadex G 25 (teneur résiduelle $\approx$ 1 p. 100), cette réduction, telle qu'on l'observe à l'air, est lente et incomplète (Figure 9 et 10).

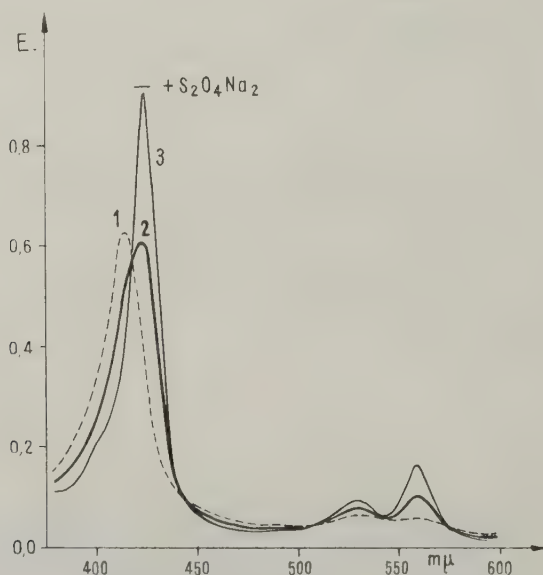


FIG. 9. — Rôle du FMN dans la réductibilité du cytochrome de l'Apo-L-LDH par le lactate : Etude spectrale.

Enregistrement au Cary 14 des spectres d'absorption de solutions d'Apo-L-LDH* (concentration 3,96 μ M d'hème) dans le tampon phosphate 0,1 M, EDTA 20 μ M, pH 7,4 et 23°.

(1) Apo-L-LDH_{Sephadex}, oxydée ; teneur en flavine : $0,95 \pm 0,02$ pour cent par rapport à l'hème (dosage fluorimétrique selon [28]) : état oxydé.

(2) Idem, dix minutes après addition de lactate (DL-lactate 66 mM) ; spectre indiquant une réduction partielle.

(3) Cuve précédente additionnée de FMN ((FMN)_{total}/(Hème) = 0,30) ; spectre enregistré après dix minutes : état totalement réduit, non modifié par addition ultérieure de S₂O₄Na₂.

(*) Apo-L-LDH_{Sephadex}, préparée selon la méthode habituelle à partir d'un échantillon de L-LDH cristallisée une fois, conservé huit jours sous atmosphère d'azote, à -15° ; activité molaire reconstituable de l'apo-enzyme : 96,7 sec.⁻¹.

Nous nous sommes proposé de voir si la réductibilité observée du constituant cytochromique de l'Apo-L-LDH par le lactate était directe ou si elle était catalysée par les traces d'enzyme reconstitué. Autrement dit, en absence de toute trace de flavine, le cytochrome est-il encore réductible par le lactate ?

Des expériences ont été faites afin de comparer dans les mêmes conditions, en particulier pour la même concentration d'Apo—L-LDH, les vitesses de réduction : (1) du cytochrome de l'Apo—L-LDH, (2) du ferricyanure ajouté. Pour connaître ces vitesses à concentration nulle de flavine, nous avons fait des déterminations avec des aliquotes d'apo—L-LDH_{sephadex} auxquelles ont été ajoutées des quantités connues de FMN ; les résultats ont été extrapolés pour (FMN) total = zéro ((FMN) total = (FMN) contenu dans l'Apo—L-LDH utilisée + (FMN) ajouté).

Ces expériences ont été faites d'abord à l'air puis sous azote après barbotage du milieu réactionnel (Azote R, 10 minutes) parce que le constituant cytochromique de la L-LDH est légèrement autoxydable [30]. Il n'a pas été possible de travailler en anoxie stricte à cause de la dénaturation de l'Apo—L-LDH_{sephadex} lors du dégazage sous vide en Thunberg.

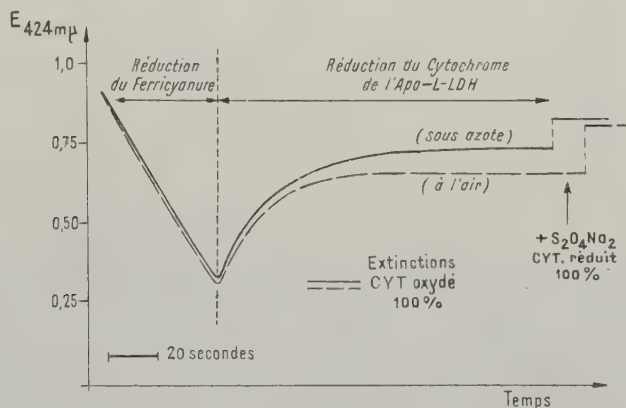


FIG. 10. — Etude de la réduction par le lactate du cytochrome de l'Apo-L-LDH contaminée par FMN.

Après addition d'Apo-L-LDH_{sephadex} (concentration finale dans les cuves 3,74 μ M, contaminée par FMN 0,95 p. 100 à laquelle est ajouté du FMN pour obtenir le rapport (FMN)_{total}/(Héme) = 2,15 pourcent) à une cuve contenant : tampon phosphate 75 mM, EDTA 15 μ M, ferricyanure 0,66 mM, DL-lactate 66 mM ; pH 7,3 et 23°, on enregistre (Cary 14) la variation d'extinction à 424 m μ au cours du temps : dans les conditions habituelles, à l'air libre (trait discontinu), ou dans une cuve de type Thunberg, le milieu étant alors barboté dix minutes avec l'azote avant l'addition de l'Apo-L-LDH (trait continu).

On a figuré les ordonnées correspondant (a) aux extinctions du cytochrome de l'Apo-L-LDH 100 pourcent oxydé et (b) aux extinctions du même 100 pourcent réduit par S₂O₄Na₂ après la fin des deux expériences.

Le potentiel d'oxydo-réduction du ferricyanure étant beaucoup plus élevé que celui du cytochrome de la L-LDH (respectivement + 360 mV et 0 mV [32]), on doit s'attendre à ce que dans un mélange d'Apo—

L-LDH et de ferricyanure, le ferricyanure soit totalement réduit avant que commence la réduction du cytochrome. Comme le montre la Figure 10, on observe bien ce phénomène : la variation de l'extinction à 424 m μ d'un tel mélange présente deux parties correspondant successivement à la réduction du ferricyanure, le cytochrome étant à l'état oxydé, puis après une brusque discontinuité, à la réduction progressive de ce dernier. Celle-ci atteint un palier correspondant à une réduction incomplète ; la hauteur de ce palier est fonction du taux d'oxygène présent dans le milieu réactionnel et résulte de l'équilibre qui s'établit entre le phénomène de réduction et la réoxydation par autoxydation.

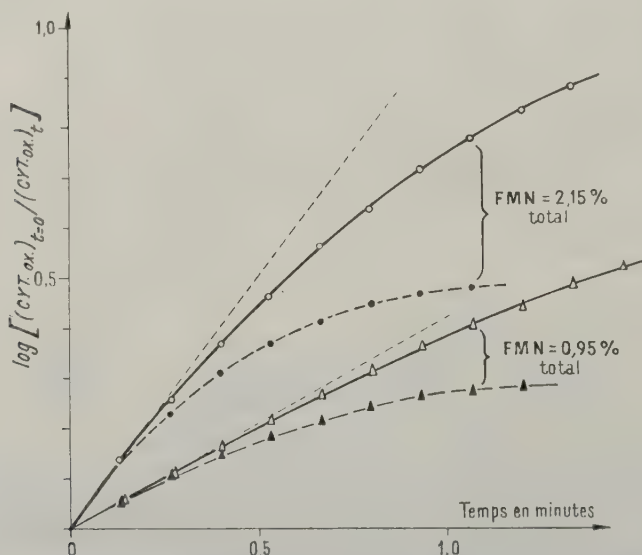


FIG. 11. — Etude de la réduction par le lactate du constituant cytochromique de deux solutions d'Apo-L-LDH contenant des taux de FMN de 0,95 et 2,15 %.

Représentation graphique logarithmique d'expériences du type présenté Figure 10, effectuées (1) avec l'Apo-L-LDH_{Sephadex}, (FMN contaminant 0,95 pour cent par rapport à l'hème), (2) avec l'Apo-L-LDH précédente additionnée de FMN ((FMN)_{total}/(Hème) = 2,15 pour cent) :

- soit à l'air libre (trait discontinu)
- soit sous azote (trait continu).

La pente des tangentes à l'origine mesure les constantes de vitesse de réduction du cytochrome de l'Apo-L-LDH.

La réduction du constituant cytochromique doit théoriquement être du premier ordre ; par conséquent, nous avons interprété les résultats selon la représentation logarithmique : $\log [(Cyt. Oxydé)_{t=0} / (Cyt. Oxydé)_t] = f(\text{Temps})$. Les graphiques obtenus (Figure 11) ne sont pas

linéaires, comme on pouvait l'attendre, même pour les expériences faites sous azote, parce que le milieu n'est pas rigoureusement anoxyque. Ils permettent toutefois une mesure correcte des vitesses initiales de réduction, indépendantes du taux d'oxygène présent. Lorsque l'Apo-L-LDH est mise en présence de quantités variables et petites de FMN, on constate que les deux graphiques représentant les variations de (1) la vitesse de réduction du ferricyanure et (2) la vitesse de réduction du cytochrome, en fonction de la quantité de FMN total présent, sont deux droites qui passent par l'origine des axes (Figures 12).

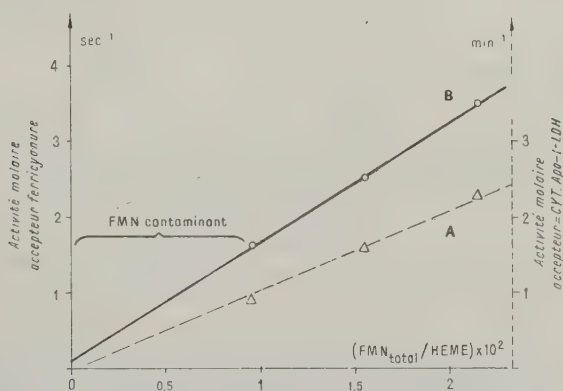


FIG. 12. — Effet de la teneur en flavine (A) sur la vitesse de réduction du constituant cytochromique de l'Apo-L-LDH, (B) sur l'activité catalytique de celui-ci (accepteur ferricyanure).

Interprétation des résultats des expériences du type décrit Figure 10. Les vitesses de réduction du ferricyanure sont exprimées en activité molaire par hème (sec^{-1}) (—o—o—) ; les constantes de vitesse de réduction du cytochrome de l'Apo-L-LDH sont déduites des représentations graphiques logarithmiques cf Figure 11, et exprimées en activité molaire par hème (min^{-1}) ($\text{--}\Delta\text{--}\Delta\text{--}$).

Etant donné la sensibilité de la méthode utilisée, on peut affirmer que les vitesses de réduction du ferricyanure, aussi bien que du cytochrome, sont nulles lorsque la concentration de flavine (FMN total) est elle-même égale à zéro (pratiquement, l'activité molaire est alors inférieure à un millièrme de celle de l'Apo L-LDH resaturée par FMN).

Ainsi donc, il est prouvé que l'hémoprotéine dépourvue de toute trace de flavine n'a plus aucune activité catalytique et que, d'autre part, son constituant cytochromique n'est plus réductible par le lactate.

La réduction lente par le lactate du cytochrome de l'Apo—L-LDH contenant des traces de FMN résulte par conséquent d'une réduction intermoléculaire, catalysée par les traces d'enzyme reconstitué, l'hémoprotéine servant d'accepteur d'électrons. La vitesse de cette réduction intermoléculaire est très lente ; en effet, l'activité molaire de la L-LDH reconstituée avec le cytochrome de l'Apo—L-LDH comme accepteur

n'est que 1 p. 100 environ de l'activité molaire avec le ferricyanure comme accepteur.

3°) Cristallisation de la L-LDH reconstituée.

Nous avons pu cristalliser la L-LDH reconstituée à partir d'un mélange Apo-L-LDH + FMN (dans le rapport 1:1). Le procédé de cristallisation utilisé (cf Tableau V) est celui qui a permis à MORTON et SHEPLEY [31] de cristalliser la L-LDH « type 2 » (L-LDH ne contenant pas de DNA) ; il s'agit d'une dialyse contre un milieu contenant du lactate, du sulfate de magnésium, additionné de FMN dans notre cas.

Les cristaux de la L-LDH reconstituée ont la même apparence au microscope que ceux de la L-LDH « type 1 » (contenant le DNA) [1] ; ils sont très fragiles et apparaissent souvent brisés.

Nous avons déterminé la teneur en flavine des cristaux ainsi obtenus. Afin d'éliminer le FMN contaminant, les cristaux de L-LDH reconstituée sont lavés par resuspension dans la solution de dialyse exempte de flavine avant d'être dissous. Le contenu de flavine de ces cristaux

TABLEAU V.
Bilans d'une cristallisation de la L-LDH reconstitué
(Apo—L-LDH + FMN).

Produits traités et analysés (1)	Quantités de protéine mg (2)	Activités molaires (3)	
		sans FMN	+ FMN 20 μ M
Apo—L-LDH _{brute}	6,63	30	200
Culot après dialyse (amorphe, insol.)	—	—	—
Surnageant après dialyse	4,98	22,5	23,3
L-LDH reconstituée (Apo—L-LDH + FMN).....	10,15	—	200
Culot après dialyse (Cristaux dissous).....	3,75	205	236
Surnageant après dialyse	5,50	180	180

(1) L'Apo—L-LDH_{brute} est obtenue selon la technique habituelle à partir d'une solution fraîche de cristaux de L-LDH d'activité molaire 300 sec.⁻¹. Une partie de cette Apo—L-LDH_{brute} est additionnée de FMN (FMN/Hème = 1) et constitue la L-LDH reconstituée. On soumet parallèlement les solutions d'Apo—L-LDH_{brute} et de L-LDH reconstituée à une dialyse de trois jours à 4° et à l'obscurité contre la solution : DL-lactate 50 mM, EDTA 0,2 mM, Mg SO₄ 1 mM pH 6,8 désoxygénée par barbotage d'azote « R ». Dans le cas de la L-LDH reconstituée, cette solution est additionnée de FMN 15 μ M. Le contenu des sacs de dialyse est centrifugé : le surnageant et le culot redissous sont analysés.

(2) et (3) : déterminations selon les techniques décrites Tableau III. Les activités molaires (sec.⁻¹) (accepteur ferricyanure) sont mesurées sans ajouter de FMN dans les cuves de mesure (activité résiduelle de l'Apo —L-LDH_{brute}) et en présence de FMN 20 μ M (activité de la L-LDH reconstituée) (cf. Matériel et Techniques).

a été déterminé fluorimétriquement : une prise d'enzyme contenant 2,19 μ moles d'hème est chauffée à 50° pendant cinq minutes en milieu chlorhydrique 0,4 N, après centrifugation le surnageant neutralisé est dosé au fluorimètre [28] : on a trouvé 2,32 μ moles de flavine soit 1,06 moles par mole d'hème.

L'activité molaire de la L-LDH reconstituée cristallisée est très élevée, 236 sec^{-1} , et correspond à 79 p. 100 de celle de la L-LDH non traitée. Au cours des mesures d'activité, les cinétiques de réduction du ferricyanure sont d'ordre zéro dans le temps même en absence de FMN dans le mélange réactionnel standard.

L'Apo-L-LDH elle-même n'est pas cristallisable par ce même procédé : l'échantillon qui a été dialysé dans les mêmes conditions que la L-LDH reconstituée mais en absence de flavine n'a fourni, à l'issue de l'opération, qu'un léger précipité amorphe et insoluble dans le tampon phosphate. Il a en outre perdu presque toute sa capacité de réactivation (Tableau V). Il semble donc que la resaturation par le FMN de l'Apo-L-LDH modifie considérablement la solubilité de cette dernière ; il pourrait s'agir d'une modification de la structure tertiaire de la protéine comme IWATSUBO et DI FRANCO en ont émis l'hypothèse à d'autres propos [28].

DISCUSSION.

Le succès que nous avons enregistré dans la séparation réversible de la flavine de la L-LDH, nous a permis d'obtenir des informations sur son rôle dans la fonction catalytique de l'enzyme. Nous allons discuter ces résultats et aborder le problème du rôle catalytique du constituant cytochromique.

Il est important de souligner dès l'abord que l'Apo-L-LDH, tel qu'elle est préparée en milieu acide n'a pas subi de dénaturation importante. En effet, la L-LDH reconstituée par addition de flavine à cet apoenzyme a des propriétés très voisines de celles de la L-LDH native ; l'activité molaire est comparable (80 p. 100), le spectre d'absorption, aussi bien que le potentiel redox [32] du groupe cytochromique sont identiques, la fluorescence de la flavine oxydée fixée est totalement éteinte dans les deux cas [28]. La L-LDH reconstituée (Apo-L-LDH + FMN 1:1) a pu être cristallisée dans des conditions très voisines de celles qui provoquent la cristallisation de la L-LDH native. Cependant, nous montrerons par ailleurs [33] que quelques différences se manifestent dans les études cinétiques, portant sur une augmentation de la valeur du K_m relatif au substrat, une augmentation des valeurs des constantes d'inhibition relatives aux inhibiteurs compétitifs, et surtout une diminution de l'affinité apparente pour la flavine. L'ensemble de ces changements reflète sans doute une légère modification irréversible de la structure protéique tertiaire par l'acidité du milieu au cours du traitement dissociant.

Le rôle de la flavine dans l'activité catalytique a toujours été considéré comme essentiel par les différents auteurs qui ont travaillé sur cet enzyme quoique aucun des arguments apportés jusqu'à maintenant n'ait été convainquant. L'essentiel des données accumulées sur ce point concernait l'observation qualitative de l'apparition de fluorescence au cours d'inactivations variées de l'enzyme, ces phénomènes étant réputés irréversibles [1, 5, 6, 7, 8].

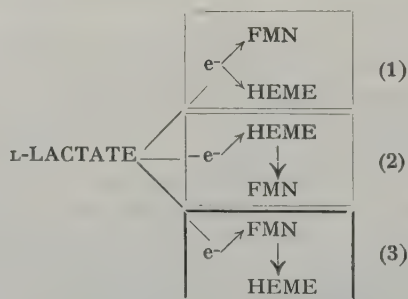
L'étude quantitative, au cours du vieillissement de la L-LDH par conservation prolongée à basse température, de la corrélation entre la perte d'activité et la perte de flavine met en évidence une relation directe entre ces deux phénomènes.

L'étude des propriétés enzymatiques de l'Apo-L-LDH obtenue par dissociation de la flavine dans des conditions où la partie protéique n'est pas dénaturée, nous a permis de montrer que le FMN joue bien un rôle essentiel dans l'activité catalytique de cet enzyme. En effet, la dissociation totale de la flavine abolit :

1 — La fonction catalytique de l'enzyme, qu'il s'agisse du transfert des électrons du lactate au ferricyanure ou au ferricytochrome c.

2 — La possibilité pour le constituant cytochromique de l'Apo-L-LDH d'être réduit par le lactate.

Ces deux phénomènes conjugués prouvent que la présence du groupe flavinique est essentielle pour le transfert des électrons provenant du L-Lactate aux accepteurs et à l'hème du cytochrome. Il est très probable que le FMN est en réalité un intermédiaire dans ce transfert. Parmi les trois schémas suivants que l'on peut envisager à priori, seul le troisième représenterait la voie des électrons dans la L-LDH :



Les problèmes posés par la répartition des deux électrons du L-Lactate entre la flavine et le constituant cytochromique de la L-LDH seront discutés par ailleurs [32]. Nous avons pu montrer en effet qu'au cours de titrages anoxyques de la L-LDH oxydée par le L-lactate, le constituant cytochromique et le FMN passent de l'état totalement oxydé à l'état réduit en recevant respectivement 1 et 2 électrons (à l'équilibre l'existence d'une forme semi-réduite du FMN n'a pas été détectée).

Un deuxième aspect du mécanisme concerne le problème du point de transfert des électrons entre la L-LDH et les accepteurs. MORTON et al. et HINKSON et MAHLER avaient suggéré sur la base d'expériences de cinétique enzymatique que le ferricytochrome c recevait les électrons uniquement du constituant cytochromique de la L-LDH tandis que le ferricyanure les recevait soit de la flavine, soit du cytochrome, la deuxième voie étant favorisée aux faibles concentrations de cet accepteur.

Si on admet ce schéma et, compte tenu du fait que l'activité molaire de l'enzyme est pratiquement identique pour la réduction de ces deux accepteurs, on doit conclure que la vitesse de transfert des électrons entre le FMN et l'hème de la L-LDH ne peut être l'étape limitante de la réaction globale.

Nous avons vu que la vitesse de réduction *intermoléculaire* du constituant cytochromique de l'Apo—L-LDH par l'holoenzyme (reconstitué) est environ cent fois plus petite que la vitesse de réduction de ferricyanure par la même concentration d'holoenzyme. Ainsi donc se trouve posé le problème très intéressant de savoir si l'hème de la L-LDH participe vraiment au transfert des électrons du lactate au cytochrome c. Si cette voie de transfert existe, il conviendrait, pour rendre compte de la vitesse de réduction catalytique de cet accepteur, d'envisager, comme l'ont fait MORTON et ses collaborateurs [3], l'existence d'un mécanisme de transfert *intramoléculaire* rapide des électrons entre la flavine et l'hème de la L-LDH.

Ce problème devrait être résolu dans un avenir proche puisque deux groupes de chercheurs, MORTON et STURTEVANT d'une part, et IWATSUBO et DI FRANCO d'autre part, ont entrepris indépendamment la mesure directe des vitesses de réduction par le lactate, à la même concentration d'enzyme, des accepteurs (ferricyanure et ferricytochrome c) et des deux groupes prosthétiques de l'enzyme. Ces mesures utilisent la technique spectrophotométrique d'étude des réactions rapides MORTON et STURTEVANT [34] ont travaillé dans des conditions optimales (milieu anoxyque, 25°, pH 8,0, concentrations de lactate voisines de la valeur de K_m ou supérieures à celle-ci) tandis qu'IWATSUBO et DI FRANCO [35 et in 16] pour des raisons instrumentales, ont dû utiliser des conditions sous optimales (à l'air libre, 6°, pH 5,8 et concentrations de lactate inférieures à la valeur de K_m) pour diminuer les vitesses de réaction.

Les résultats obtenus dans ces deux laboratoires sont en bon accord en ce qui concerne la réduction du constituant cytochromique. Ils montrent clairement que la vitesse de réduction de ce groupe prosthétique est de beaucoup inférieure à la vitesse de réduction des deux accepteurs ; par conséquent, *le transfert des électrons aux accepteurs passe principalement par une autre voie que l'hème.*

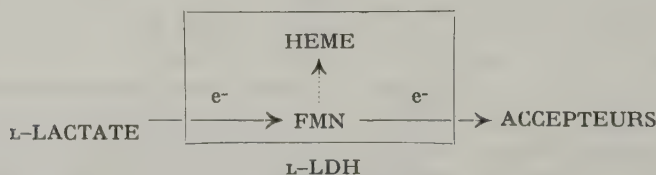
En ce qui concerne le FMN, les expériences d'IWATSUBO et DI FRANCO, basées sur les variations d'extinction à 445 m μ corrigées de la participation du cytochrome au spectre à cette longueur d'onde, donnent les résultats suivants :

(1) la constante de vitesse de la réduction du groupe prosthétique flavinique est au moins égale à la constante de vitesse de la réduction du ferricytochrome c ;

(2) elle est au moins trois fois plus grande que la constante de vitesse de la réduction du ferricyanure.

MORTON et STURTEVANT n'ont pas calculé à partir de leurs données expérimentales la vitesse de réduction de la flavine elle même et n'apportent donc pas encore d'informations précises à ce sujet dans les conditions optimales.

Jusqu'à présent, aucune donnée expérimentale n'a apporté d'informations sur la participation éventuelle d'autres groupes que la flavine et l'hème dans le transfert global des électrons. Si les résultats d'IWATSUBO et DI FRANCO sont confirmés dans les conditions optimales (*), il sera prouvé que le constituant cytochromique de la L-LDH n'intervient que pour une part minime dans le transfert catalytique des électrons du L-lactate aux accepteurs ; la voie principale de transfert serait alors la suivante :



Cette conclusion expliquerait que les tentatives pour mettre en évidence une interaction entre la flavine et le constituant cytochromique de l'enzyme aient échoué jusqu'à présent. En particulier, nous avons montré que la présence du FMN ne modifie en première analyse, ni les caractères spectraux, ni le potentiel d'oxydoréduction [32] du constituant cytochromique de la L-LDH.

DEUXIÈME PARTIE.

ÉTUDE ENZYMATIQUE DE L'ÉQUILIBRE D'ASSOCIATION DE LA FLAVINE A L'HÉMOProtéINE.

INTRODUCTION.

Nous avons pu séparer la flavine de la L-LDH cristallisée et obtenir un apoenzyme (hémoprotéine) spécifiquement réactivable par le FMN [1].

Après avoir étudié les propriétés physicochimiques et enzymatiques de cette Apo-L-LDH et montré le rôle du groupe flavinique dans le transfert des électrons provenant du L-lactate aux accepteurs et au constituant cytochromique [2], nous décrivons une étude de l'équilibre d'association de la flavine à l'hémoprotéine.

Ce travail est basé sur l'emploi des techniques de cinétique enzymatique. Une étude parallèle, utilisant une méthode fluorimétrique, a été faite par IWATSUBO et DI FRANCO [3]. La comparaison des résultats obtenus par ces deux techniques présente un grand intérêt et sera faite dans notre discussion.

Dans les deux cas, l'affinité apparente de l'hémoprotéine pour le FMN a pu être mesurée dans des conditions variées. Il a été possible de montrer que le substrat et un inhibiteur compétitif (l'oxalate) exercent un effet coopératif pour la fixation du FMN sur l'hémoprotéine.

Dans le but d'étendre ces observations à la L-LDH native, nous présenterons une étude comparative systématique des propriétés cinétiques de la L-LDH native et de l'enzyme reconstitué (Apo-L-LDH + FMN saturant).

MATÉRIELS ET TECHNIQUES.

Les différentes techniques générales de mesure, aussi bien que les méthodes de préparation de la L-LDH et de l'Apo-L-LDH (hémopro-

téine sans flavine) ayant été exposées en détail précédemment, nous renvoyons le lecteur à cet autre article [2].

Une technique plus particulière (détermination de la constante de dissociation du complexe Apo—L-LDH-FMN par une méthode de dilution) sera décrite dans la partie consacrée aux résultats expérimentaux pour faciliter la compréhension de ces derniers.

L'affinité de l'Apo—L-LDH pour le FMN a été mesurée par deux méthodes conduisant à la détermination de deux constantes qui, comme nous le discuterons, peuvent avoir une signification différente :

a) d'une part, l'étude de la variation, avec la concentration de flavine, de la vitesse de la réaction catalysée par des aliquotes d'Apo—L-LDH fournit une constante apparente de demi-saturation que nous appellerons K_{FMN} ;

b) d'autre part, une méthode de dilution permet de déterminer la valeur de la constante de dissociation du complexe Apo—L-LDH-FMN; pour la distinguer de la précédente, nous l'appellerons K .

Lorsqu'on étudiera les variations des valeurs de ces deux constantes en fonction des concentrations de quelques réactifs, les symboles K'_{FMN} et K' seront utilisés.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

1. — Etude de la combinaison de l'Apo—L-LDH avec le FMN.

1°) *Variation de la vitesse de la réaction catalysée avec la concentration de FMN ; effet de la riboflavine et des ions phosphate et pyrophosphate.*

L'Apo—L-LDH préparée par traitement acide contient, comme nous l'avons vu par ailleurs [2], une certaine quantité de flavine contaminante et présente une certaine « *activité résiduelle* ». Nous avons prouvé [2] que cette activité résiduelle était réellement due à la présence de flavine, l'activité propre à l'apoenzyme étant réellement nulle.

L'étude des variations de l'activité enzymatique avec la concentration de flavine ajoutée à l'apoenzyme met en évidence une courbe typique de saturation (Figure 1) qui permet de déterminer la valeur de la constante apparente de demi-saturation (K_{FMN}), ou concentration de flavine donnant la demi-vitesse maximum. Les courbes ainsi obtenues ont été analysées par les deux représentations graphiques classiques : $1/v = f(1/FMN)$ et $\log(v/V - 1) = f(\log(FMN))$ afin de déterminer la valeur de K_{FMN} et le nombre de molécules de flavine nécessaires pour réactiver un site. Les résultats d'une telle expérience, faite également en présence d'une concentration élevée de riboflavine, montrent :

a — que la variation de la vitesse de la réaction catalysée avec la concentration de FMN suit bien une simple hyperbole (Figure 1) ;

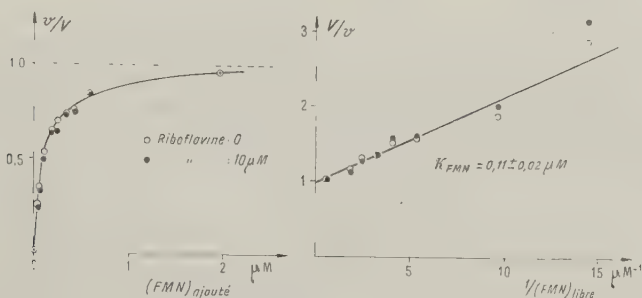


FIG. 1. — Réactivation de l'Apo-L-LDH par le FMN : courbe de saturation. Détermination de la constante de demi-saturation K_{FMN} .

Composition du mélange réactionnel : tampon Tris/Chlorure 50 mM, EDTA 20 μ M, ferricyanure 0,66 mM, DL-lactate 66 mM, pH 7,3, 30° ; auquel est ajouté le FMN aux concentrations indiquées en abscisses. Réaction déclenchée par addition d'une aliquote d'Apo-L-LDH passée sur une colonne de Sephadex G25. La concentration d'Apo-L-LDH réactivable dans les cuves de mesure est 22 m μ M (calculée d'après l'activité molaire 236 sec.⁻¹ pour la L-LDH reconstituée [2]).

v et V sont respectivement les vitesses de réduction du ferricyanure dans les conditions précédentes et à saturation en flavine (vitesse maximale).

A gauche : courbe de saturation.

A droite : détermination de la valeur de K_{FMN} par la représentation des variations de v/V en fonction de l'inverse des concentrations de flavine libre dans les cuves (FMN ajouté corrigé du FMN fixé à l'Apo-L-LDH) :

- en absence de riboflavine dans les cuves (—○—),
- en présence de riboflavine 10 μ M dans les cuves (—●—).

b — qu'une seule molécule de FMN suffit à activer un site enzymatique puisque la pente de la représentation logarithmique est égale à l'unité (Figure 2).

c — que la riboflavine n'exerce aucune action sur la fixation du FMN même à une concentration 100 fois plus forte que la concentration de FMN produisant la demi-saturation (Figure 1).

Les valeurs de K_{FMN} ainsi obtenues varient notablement avec la composition saline du milieu réactionnel. Dans le tampon Tris/HCl, la valeur de K_{FMN} est 0,10 à 0,15 μ M à pH 7,2-7,3 et 30°. Cette valeur est obtenue aussi bien avec l'Apo-L-LDH brute qu'avec des solutions passées sur Sephadex ; elle ne varie pas non plus lorsque, au cours de la conservation, les solutions d'Apo-L-LDH ont perdu une partie de leur capacité de réactivation. Les ions phosphate et pyrophosphate augmentent considérablement les valeurs de K_{FMN} par compétition avec le FMN (Figure 3) ; on peut calculer dans ces expériences les valeurs respectives des constantes d'inhibition K_i relatives au phos-

phate et au pyrophosphate dans les conditions expérimentales utilisées : pour le phosphate $K_i = 14 \pm 3$ mM et pour le pyrophosphate $K_i = 8 \pm 2$ mM.

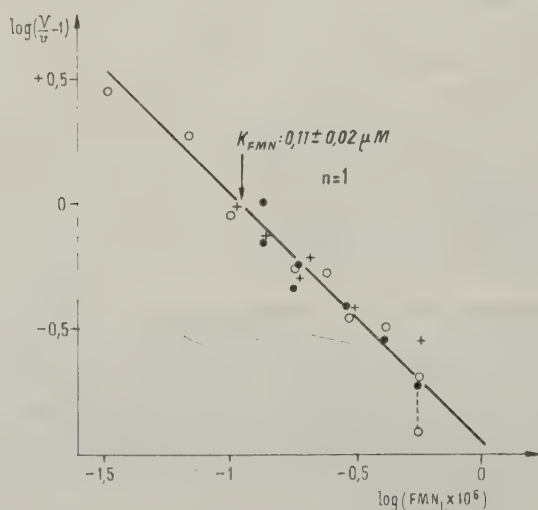


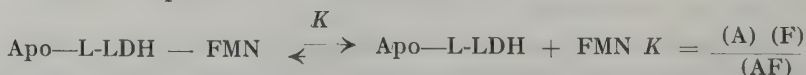
FIG. 2. — Réactivation de l'Apo-L-LDH par le FMN : détermination du nombre de molécules de FMN fixées par site actif de l'enzyme.

Conditions expérimentales identiques à celles de la Figure 1. Une solution d'Apo-L-LDH _{Sephadex} est conservée congelée à -15° : trois expériences indépendantes (respectivement o, •, +) sont faites par prélèvement d'un échantillon sur ce stock.

v et V : cf Figure 1. Représentation graphique logarithmique de BERGMAN et SEGAL [10] : la pente (changée de signe) de la droite donne le nombre n de molécules de FMN nécessaires pour réactiver un site enzymatique. Les concentrations de flavine libre sont calculées en tenant compte du FMN fixé sur l'Apo-L-LDH (cf Figure 1).

2°) Détermination de la valeur de la constante de dissociation du complexe Apo—L-LDH—FMN par une méthode de dilution :

On étudie l'équilibre de dissociation suivant :



où (AF), (A) et (F) représentent les concentrations respectives du complexe Apo—L-LDH — FMN, de l'Apo—L-LDH et du FMN, K étant la constante de dissociation du complexe.

Cet équilibre peut être étudié par la technique classique de dilution : si on dilue un mélange contenant l'Apo—L-LDH et le FMN en quantités voisines, il se produit une diminution de la proportion du complexe $(AF)/(A)_{\text{tot}}$. On peut observer cette diminution de $(AF)/(A)_{\text{tot}}$ si on dispose d'une méthode de mesure de (AF) et si la zone

de concentration est favorable. Nous allons examiner successivement : (a) la technique de mesure de $(AF)/(A)_{tot.}$ et (b) le calcul de la valeur de K .

a — Mesure de $(AF)/(A)_{tot.}$ dans les dilutions.

Des observations fluorimétriques ont montré que lorsqu'on dilue dans le tampon phosphate un mélange d'Apo—L-LDH et de FMN (concentrations respectives 20 et 10 μM) il se produit une dissociation progressive jusqu'à un nouvel état d'équilibre qui est atteint en moins d'une minute à 20° ; la dissociation ne se produit jamais instantanément [3].

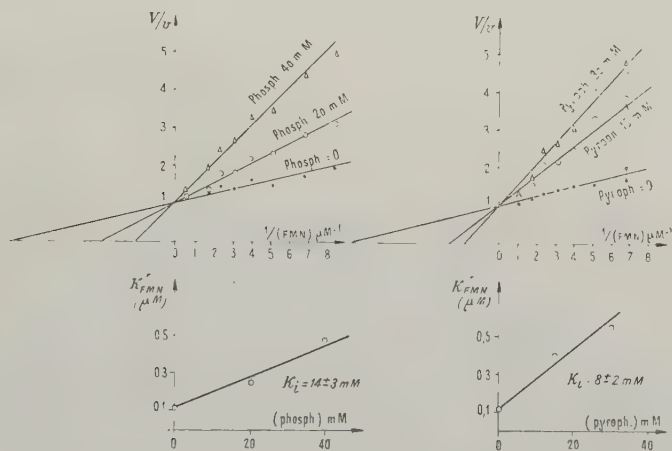


FIG. 3. — Réactivation de l'Apo-L-LDH par le FMN : Inhibition compétitive par le phosphate et le pyrophosphate.

Conditions expérimentales identiques à celles de la Figure 1, le mélange réactionnel étant additionné de phosphate ou de pyrophosphate aux concentrations indiquées sur les figures.

Les constantes d'inhibition K_i relatives au phosphate et au pyrophosphate sont déterminées par la représentation classique de la variation linéaire des constantes apparentes de demi-saturation relatives au FMN (K'_{FMN}) en fonction de la concentration des inhibiteurs.

Quand cet équilibre est atteint, une aliquote de cette solution (solution initiale diluée D fois) est prélevée et ajoutée au temps $t = 0$ dans une cuve contenant le mélange d'essai destinée à la mesure de l'activité enzymatique. On fait ainsi une nouvelle dilution ; celle-ci provoque une nouvelle dissociation du complexe flavoprotéique qui se traduit par une diminution progressive de la vitesse v de la réaction catalysée au cours du temps selon une loi des réactions du premier ordre : la représentation graphique $\log [(\Delta E)_{\Delta t = 15 \text{ sec.}}] = f(t)$ est linéaire. L'extrapolation de cette droite à $t = 0$ donne la vitesse initiale v_0 ou vitesse à l'instant où a été effectuée la dilution ; celle-ci est

proportionnelle à la concentration (AF) du complexe actif dans la cuve de mesure au temps zéro, égale elle-même à la concentration (AF) dans la solution intermédiaire. On a vu en effet que la dissociation n'intervient pas instantanément mais progressivement dans le temps.

Par conséquent, le quotient v_o/V où V est la vitesse maximale déterminée de façon parallèle mais en présence d'une concentration saturante de flavine, est égal au rapport $(AF)/(A)_{\text{tot}}$ dans la solution où l'équilibre de dissociation s'est établi.

b — Calcul de la valeur de K :

L'équation de l'équilibre de dissociation s'écrit sous la forme générale :

$$(1) \frac{(e - c)(F - c)}{c} = K \text{ avec : } \begin{array}{l} e = \text{concentration totale de} \\ \text{l'Apo—L-LDH réactivable.} \\ F = \text{concentration totale du} \\ \text{FMN.} \\ c = \text{concentration du complexe} \\ \text{actif (AF) à l'équilibre.} \end{array}$$

Etant donné que dans le système étudié seul le complexe Apo—L-LDH—FMN est actif enzymatiquement, les vitesses V et v_o définies ci-dessus sont respectivement proportionnelles aux concentrations e et c :

$$V = k_3 \times e \quad \text{et} \quad v_o = k_8 \times c$$

où k_3 représente l'activité molaire du complexe Apo—L-LDH—FMN.

En posant $X = v_o/V$, on peut établir l'équation générale des vitesses qui est classique :

$$(2) \quad X^2 - X \frac{(1 + e/K + F/K)}{e/K} + \frac{F/K}{e/K} = 0$$

Dans le cas particulier qui sera étudié, nous avons utilisé une solution contenant l'Apo—L-LDH et la flavine dans un rapport fixe soit $\alpha = F/e$. L'équation des vitesses peut alors être écrite sous la forme :

$$(3) \quad e(1-X) = \alpha e \frac{(1-X)}{X} - K$$

Pour une série de dilutions variables (de 1 à 20 fois) de la solution initiale, on mesurera v_o et V selon la méthode décrite ci-dessus. La représentation des résultats sous la forme : $e(1-X)$ en fonction de $e(\frac{1-X}{X})$ linéaire, permettra de déterminer la valeur de la constante K .

c — Résultats expérimentaux.

La valeur de la constante de dissociation K a été déterminée à 0° dans le tampon phosphate 0,1M, EDTA 20 μ M pH 7,4. Dans ces expériences nous avons utilisé l'Apo—L-LDH_{brute} préparée selon la méthode habituelle à pH 2,5 qui contenait environ 20 p. 100 de la flavine ini-

tiale. La concentration de l'Apo—L-LDH réactivable de cette solution est calculée à partir de son activité en présence d'une concentration saturante de FMN (V) en utilisant la valeur 236 sec.^{-1} pour l'activité molaire de la L-LDH reconstituée [2].

En exprimant les résultats de ces expériences selon la représentation graphique décrite au paragraphe précédent, on obtient effectivement une droite (Figure 4) ; la valeur de $-K$ est donnée par l'ordonnée à l'origine. La valeur obtenue est : $K = 2 \pm 0,5 \mu\text{M}$ dans le tampon phosphate $0,1\text{M}$ pH $7,4$ à 0° .

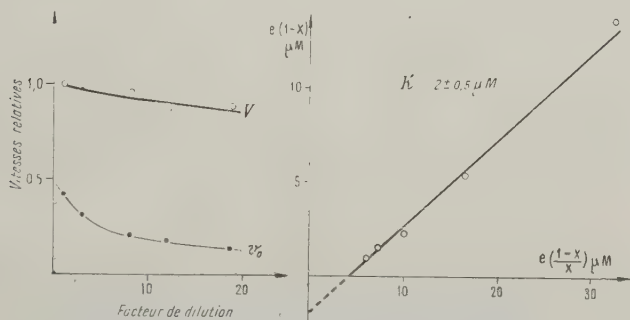


FIG. 4. — Détermination de la constante de dissociation de la flavine de la L-LDH reconstituée, par une méthode de dilution.

L'Apo-L-LDH_{brute}, préparée selon la technique habituelle mais à pH $2,5$, est un mélange où l'Apo-L-LDH réactivable et le FMN sont présents aux concentrations initiales respectives $23,5$ et $10,8 \mu\text{M}$.

Cette solution est diluée de 1 à $18,7$ fois dans : tampon phosphate $0,1\text{M}$, EDTA $20 \mu\text{M}$, pH $7,4$ à 0° . Après deux minutes, lorsque l'équilibre de dissociation est établi, une prise de la solution diluée contenant une quantité fixe d'Apo-L-LDH réactivable est déposée dans une cuve de mesure d'activité contenant le mélange réactionnel : tampon phosphate 66 mM , EDTA $13 \mu\text{M}$, ferricyanure $0,66 \text{ mM}$, DL-lactate 66 mM ; pH $7,3$; 30° . En présence de FMN $20 \mu\text{M}$ dans les cuves, on mesure les vitesses maximales V proportionnelles à la concentration totale d'Apo-L-LDH réactivable ; en absence de FMN (autre que celui qui est contenu dans l'Apo-L-LDH), on mesure les vitesses v_0 (cf texte) proportionnelles aux concentrations du complexe actif (AF) dans les solutions diluées.

Représentations graphiques : à gauche : variations de V et v_0 en fonction du facteur de dilution ; à droite : détermination de la valeur de la constante de dissociation K (cf texte) ; e : concentration d'Apo-L-LDH réactivable relative à chaque dilution. $X = v_0/V$.

Puisque la représentation précédente est bien linéaire, on peut déterminer K à partir d'un couple de valeurs de v_0/V pour deux valeurs de la concentration du mélange Apo—L-LDH + FMN. Nous avons étudié l'effet du lactate et de l'oxalate sur la valeur de K de cette manière en calculant la valeur de K par la formule (4) obtenue par réarrangement de (3) :

$$(4) \quad K = e \left[X + \frac{\alpha}{X} - (\alpha + 1) \right]$$

On constate que la valeur de la constante K décroît lorsque la concentration de L-lactate ou d'oxalate augmente dans le mélange de dilution (Figure 5). Pour les concentrations les plus élevées de ces deux sels, le taux de dissociation du FMN devient trop faible pour permettre une détermination précise de la valeur de K dans les conditions utilisées ; les valeurs approximatives ainsi obtenues sont : $K' \leq 0,15 \mu\text{M}$ en présence de L-lactate (à 0°) et $K' \leq 0,04 \mu\text{M}$ en présence d'oxalate (à 30°) dans le tampon phosphate $0,1\text{M}$ pH 7,4.

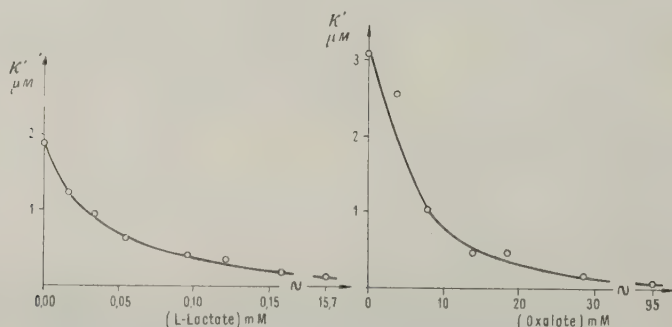


FIG. 5. — Effet coopératif entre le site de fixation du substrat et le site de fixation de la flavine de l'Apo-L-LDH.

Effet du L-lactate (à gauche) : le mélange initial d'Apo-L-LDH et de FMN (concentration initiale d'Apo-L-LDH réactivable $e = 18,8 \mu\text{M}$, $\alpha = (\text{FMN})/e = 0,50$) est dilué 19,4 fois dans le tampon (phosphate $0,1 \text{ M}$, EDTA $20 \mu\text{M}$, pH 7,4 à 0°) contenant des concentrations variables de L-lactate (en abscisses).

Effet de l'oxalate (à droite) : le mélange initial d'Apo-L-LDH et de FMN (concentration initiale d'Apo-L-LDH réactivable $e = 15,8 \mu\text{M}$, $\alpha = (\text{FMN})/e = 0,70$) est dilué 19,4 fois dans le tampon (phosphate $0,1 \text{ M}$, EDTA $20 \mu\text{M}$, pH 7,4 à 30°) contenant des concentrations variables d'oxalate (en abscisses).

Dans les deux cas, on mesure pour chaque solution, concentrée ou diluée, les vitesses V et v_0 comme il est décrit Figure 4 ; à partir de ces valeurs, on calcule la valeur de la constante apparente de dissociation de la flavine K' (en ordonnées) d'après la formule (4) introduite dans le texte).

L'effet coopératif de l'oxalate a été étudié à 30° afin de pouvoir comparer la valeur de la concentration exerçant le demi-effet sur la variation de K' avec celle de la constante d'inhibition de ce même sel, déterminée par la méthode classique à cette température, soit $K_i = 10 \text{ mM}$. L'oxalate contenu dans les prises servant aux mesures de V et v_0 est dilué 20 fois dans les cuves de mesure et n'exerce pas d'inhibition notable dans ces tests en raison de la forte concentration de substrat utilisée (DL-lactate 66 mM).

3°) Variation de l'affinité apparente pour le L-lactate avec le taux de saturation en flavine de l'Apo—L-LDH.

Nous venons de montrer que le substrat et un inhibiteur compétitif de l'enzyme, l'oxalate, stabilisent le complexe flavoprotéique (Apo—L-LDH — FMN). On peut se demander si cette interaction est bien réciproque, c'est-à-dire si, inversement, l'affinité apparente pour le substrat dépend du taux de saturation en flavine de l'Apo—L-LDH.

a. *Indices de l'existence de cet effet.*

Quelques observations ont suggéré fortement que l'affinité des effecteurs pour le site de fixation du substrat dépend du taux de saturation en flavine de l'Apo—L-LDH.

Ces observations portent sur l'Apo—L-LDH_{brute} ; nous avons montré précédemment [2] que celle-ci contient une certaine quantité de flavine contaminante responsable de son « activité résiduelle » (pour définition et mesure de celle-ci, voir [2]).

Lorsqu'on mesure la valeur de la constante de Michaelis relative au L-lactate par l'étude des variations de l'activité résiduelle en fonction de la concentration du substrat, on obtient des valeurs plus élevées que celles du K_m mesuré avec la L-LDH reconstituée (Apo—L-LDH + FMN saturant, cf II, 2°). Le même phénomène a été observé pour la valeur de la constante d'inhibition relative à l'oxalate (Tableau I).

Dans les deux cas, les cinétiques suivent la loi classique : $1/v = f(1/L\text{-lactate})$ avec ou sans oxalate est linéaire.

TABLEAU I.

Valeurs des constantes apparentes K'_m (L-lactate) et K_i (oxalate) pour l'Apo—L-LDH, en présence de concentrations non saturantes et saturantes de FMN.

	K'_m L-Lactate	K_i Oxalate
Apo-L-LDH _{brute} Activité résiduelle (FMN/Héme $\approx 0,20$)	20 ± 5 mM (pH = 7,3)	10 mM (pH = 7,3)
L-LDH reconstituée (Apo-L-LDH _{brute} + FMN saturant)	4 à 5 mM (pH = 7,3)	5 ± 1 mM (pH = 7,6)

Les valeurs de K'_m (L-lactate) sont obtenues en étudiant les variations de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de substrat ; pour l'Apo-L-LDH_{brute} les vitesses initiales extrapolées à $t = 0$ des cinétiques du premier ordre ont été utilisées (cf [2] et cet article : I, 2°).

Les valeurs de K_i (oxalate) sont calculées à partir des variations de K'_m (L-lactate) en fonction de la concentration d'oxalate (inhibition compétitive).

b. *Stabilisation de l'Apo—L-LDH par la sérumalbumine.*

Afin d'étudier en détail la variation de K_m (L-lactate) en fonction du taux de saturation en flavine de l'Apo—L-LDH, il convenait de travailler avec l'Apo—L-LDH_{Sephadex} (ne contenant que des traces de flavine, cf [2]) et des concentrations simultanément faibles de substrat et de flavine. Dans ces conditions, les mesures cinétiques sont très

difficiles, voire même impossibles à cause de l'instabilité de l'Apo—L-LDH_{Sephadex}.

Pour surmonter cet écueil, nous avons stabilisé l'apoenzyme en ajoutant de la sérualbumine humaine (0,3 mg/ml) au mélange réactionnel ; cette technique ayant été utilisée avec succès, dans le même but, par THEORELL et NYGAARD [4] pour l'étude de la combinaison du FMN à l'Apo-enzyme de l'ancien ferment jaune (NADPH₂ Diaphorase).

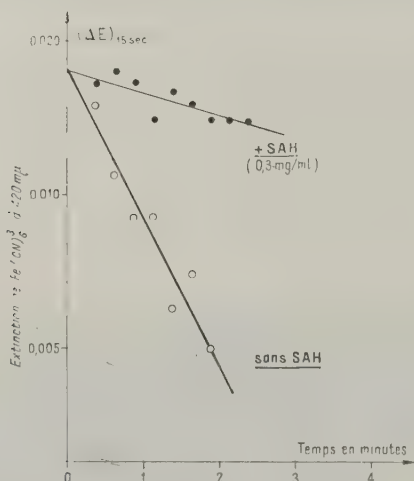


FIG. 6. — Protection, par la sérualbumine humaine, de la perte d'activité de l'Apo-L-LDH diluée, aux faibles concentrations de FMN et de L-lactate. cyanure 0,66 mM, L-lactate 1,5 mM, FMN 2,45 μM, pH 7,3, 30° ; additionné

Mélange réactionnel : tampon Tris/Chlorure 50 mM, EDTA 13 μM, ferriou non de sérualbumine humaine (0,3 mg/ml). Réaction déclenchée par addition d'une aliquote d'Apo-L-LDH_{Sephadex}.

On a porté (en ordonnées), sur une échelle logarithmique, les variations (ΔE) de l'extinction, pour des intervalles de temps successifs égaux de 15 secondes, en fonction du temps (en abscisses) ; l'ordonnée à l'origine mesure la vitesse initiale de réduction du ferricyanure, la pente des droites est proportionnelle à la vitesse d'inactivation de l'enzyme pendant la durée des mesures.

L'effet de stabilisation de l'Apo—L-LDH_{Sephadex} par la sérualbumine est très important comme on peut en juger d'après la Figure 6 qui montre les cinétiques de réduction du ferricyanure par des aliquotes d'Apo—L-LDH_{Sephadex} pour des concentrations faibles de FMN et de substrat dans le même mélange réactionnel contenant ou non la sérualbumine.

Les cinétiques de réduction du ferricyanure sont du premier ordre dans le temps ; la pente des représentations logarithmiques, linéaires, est proportionnelle aux vitesses d'inactivation dans les cuves de mesure. La vitesse du processus de dénaturation est considérablement

diminuée par la sérumbumine. On remarque, d'autre part, que les vitesses initiales extrapolées au temps zéro sont identiques, ce qui indique que la présence de sérumbumine ne modifie pas l'affinité apparente de l'Apo—L-LDH pour le FMN.

c. *Variation de K'_m (L-lactate) en fonction de la concentration de FMN.*

Les valeurs de K'_m ont été mesurées par la méthode classique, avec l'Apo—L-LDH_{Sephadex} en présence de sérumbumine (0,3 mg/ml) dans le mélange réactionnel. On a mesuré les vitesses initiales v_o (extrapolation à $t = 0$ des cinétiques du premier ordre) pour une série de valeurs de la concentration du substrat en présence de concentrations variées de FMN. Les valeurs de K'_m (L-lactate) sont calculées, pour chaque concentration de FMN, à partir de la représentation en inverses $1/v_o = f(1/\text{L-lactate})$.

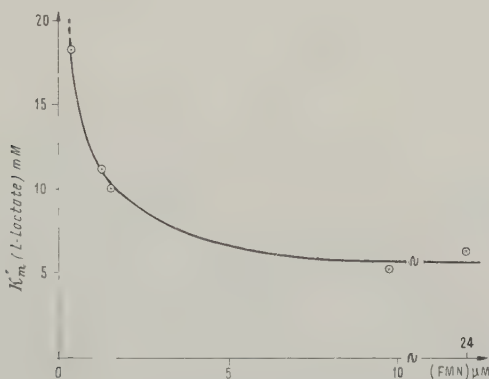


FIG. 7. — Variation de K'_m (L-lactate) avec la concentration de FMN en présence de l'Apo-L-LDH.

Détermination de K'_m (L-lactate) : on mesure la vitesse v_o de la réaction catalysée (vitesses initiales extrapolées à $t = 0$ des cinétiques du premier ordre ; cf Fig. 6), dans le mélange réactionnel décrit Fig. 6, pour une série de concentrations variées de L-lactate et une concentration fixe de FMN. La valeur de K'_m est obtenue à partir de la représentation linéaire $1/v_o = f(1/(\text{L-lactate}))$.

On a représenté les variations de K'_m (L-lactate), déterminée comme ci-dessus, pour différentes concentrations de FMN ajoutées au milieu réactionnel.

Les résultats de cette étude montrent (Figure 7) :

- 1) que la constante de Michaelis K'_m (L-lactate) varie beaucoup dans une zone de concentration de FMN qui correspond à la valeur de K_{FMN} pour l'Apo—L-LDH dans le même milieu ;
- 2) que l'affinité apparente relative au substrat (inversement proportionnelle à K'_m) tend vers une valeur limite maximale en présence d'un excès de FMN.

De même que l'affinité apparente de l'Apo—L-LDH pour le FMN est augmentée en présence de substrat (et d'oxalate), l'affinité apparente pour le substrat (inversement proportionnelle à K'_m) augmente avec le taux de saturation en flavine de l'Apo—L-LDH ; nous sommes en présence d'une véritable interaction.

II. — Etude comparée des propriétés cinétiques des L-LDH non traitée et reconstituée (Apo—L-LDH + FMN saturant).

1°) Effet de la température sur la vitesse maximale.

Cet effet a été étudié par la méthode classique en mesurant la vitesse de la réaction catalysée lorsque la L-LDH est saturée en substrat et accepteur ; la gamme de température étudiée s'étend de 5° à 30°.

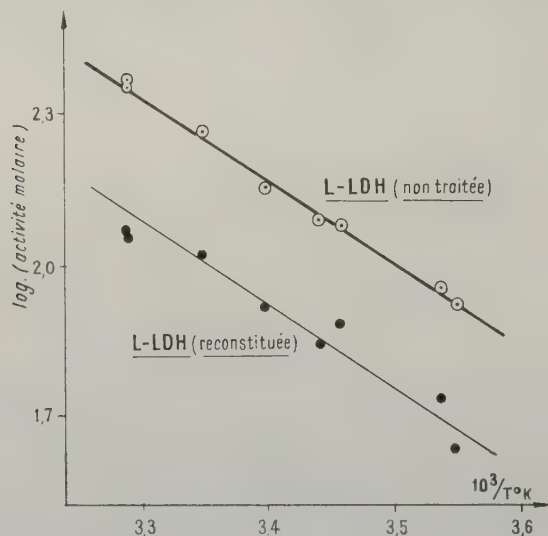


FIG. 8. — Effet de la température sur la vitesse de réduction du ferricyanure par le lactate (DL-lactate 16,6 mM) en présence des L-LDH non traitée ou reconstituée.

Composition du mélange réactionnel : tampon phosphate 66 mM, EDTA 13 μ M, ferricyanure 0,66 mM, DL-lactate 16,6 mM, pH 7,3, additionné de FMN à la concentration finale 15 μ M pour la mesure de la vitesse de la réaction catalysée par la L-LDH reconstituée. La réaction est déclenchée par addition d'une aliquote de L-LDH ou d'Apo-L-LDH dans les cuves de mesure équilibrées à différentes températures (de 5° à 30°).

Les vitesses sont exprimées en terme d'activité molaire par hème (AM) en sec⁻¹, (cf Techniques) dans la représentation graphique classique : log (AM) en fonction de l'inverse de la température absolue.

Les valeurs de l'énergie expérimentale d'activation μ ont été calculées à partir de la pente de la droite obtenue par la représentation d'ARRHENIUS : $\log(V) = f(1/T)$ puisque l'on a la relation classique : $d(\log V)/d(1/T) = \mu$. Les deux droites représentatives (Figure 8) ont

une pente pratiquement identique, ce qui montre que l'énergie d'activation du processus limitant la réaction globale est identique pour les deux formes de la L-LDH. La valeur moyenne de μ fournie par trois expériences indépendantes, $\mu = 7,5 \pm 0,5$ Kcal/mole est en bon accord avec celle obtenue par APPLEBY et MORTON soit 7,2 Kcal/Mole dans des conditions un peu différentes [5].

2°) Effet du pH sur K_m et V.

Lorsqu'on fait varier le pH du milieu réactionnel, on constate que la vitesse de la réaction catalysée, mesurée en présence de DL-lactate 16,6 mM, est beaucoup plus sensible à l'acidité dans le cas de la L-LDH reconstituée que dans celui de l'enzyme témoin (Figure 9). Ce phénomène n'est pas modifié par l'augmentation des concentrations de flavine ou d'accepteur ; par contre, il se trouve considérablement réduit par l'augmentation de la concentration du substrat. Cette observation nous a conduit à déterminer les valeurs des constantes cinétiques (vitesse maximale V et constante de Michaelis relative au L-lactate K_m) pour les deux formes de la L-LDH dans un tampon phosphate de pH

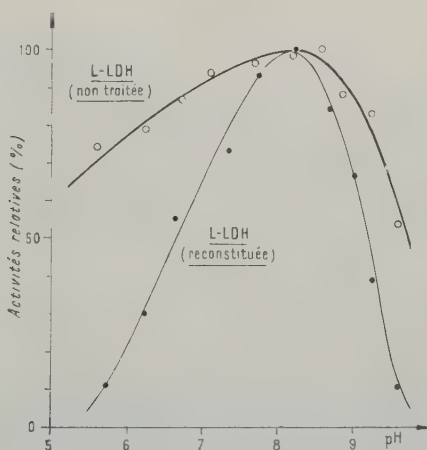


FIG. 9. — Effet du pH sur la vitesse de réduction du ferricyanure par le lactate (DL-lactate 16,6 mM) en présence de L-LDH non traitée ou reconstituée.

Composition du mélange réactionnel : tampon Tris/Chlorure 0,1M, EDTA 20 μ M, ferricyanure 0,66 mM, DL-lactate 16,6 mM ; pH variable obtenu par addition progressive de HCl à la solution de Tris base. Température 30°. Ce mélange est additionné de FMN à la concentration finale 16,6 μ M pour la mesure des vitesses de la réaction catalysée par la L-LDH reconstituée. La réaction est déclenchée par addition d'une aliquote de L-LDH non traitée ou d'Apo-L-LDH dans les cuves de mesure.

Représentation graphique : Ordonnées : vitesses relatives rapportées à 100 p. 100 pour la vitesse au pH optimum (moyenne de deux mesures pour chaque valeur du pH) ; Abscisses : valeur du pH du mélange réactionnel mesurée à 20° en fin de réaction.

variable entre les valeurs 5,0 et 8,0. Les constantes cinétiques ont été déterminées pour chaque valeur du pH en mesurant la vitesse de réduction du ferricyanure pour des concentrations variées de L-lactate ; les résultats sont exploités par la méthode classique : $1/v = f(1/s)$.

Pour les valeurs du pH inférieures à 5,8, la réduction du ferricyanure par le L-lactate en présence de L-LDH reconstituée procède selon des cinétiques du premier ordre dans le temps alors que cette réaction est habituellement d'ordre zéro [2]. Il s'agit probablement d'une inactivation progressive de l'enzyme ; le substrat ne semble pas exercer d'effet protecteur contre cette inactivation dont la vitesse augmente avec l'acidité du milieu (Figure 10).

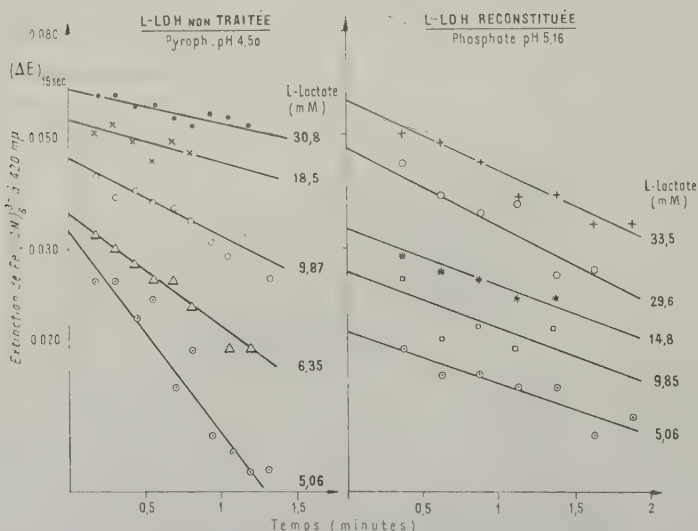


FIG. 10. — Cinétiques de réduction du ferricyanure par le L-lactate, vers pH 5, en présence de L-LDH non traitée ou reconstituée.

Composition du mélange réactionnel : tampon phosphate ou pyrophosphate 66 mM, EDTA 20 μ M, ferricyanure 0,66 mM, L-lactate variable et pH indiqués sur la figure. Température 30°. Ce mélange est additionné de FMN à la concentration finale 20 μ M pour la mesure de la vitesse de la réaction catalysée par la L-LDH reconstituée. La réaction est déclenchée par addition dans les cuves de mesure d'une prise de L-LDH non traitée ou d'Apo-L-LDH.

Les résultats de cette étude (Figure 11) montrent que les vitesses maximales relatives aux deux formes de l'enzyme varient peu avec le pH dans la région étudiée. Cette faible variation semble devoir être attribuée à un effet indirect du pH plutôt qu'à l'ionisation d'un groupe qui serait impliqué dans l'activation du complexe ES ou du processus limitant la réaction globale (à saturation en substrat et accepteur).

Par contre, du point de vue des variations de K_m , les deux formes de la L-LDH présentent des différences importantes. Pour la L-LDH reconstituée, les points représentant les valeurs de pK_m ($-\log K_m$) pour les différentes valeurs du pH se placent sur deux demi-droites dont les pentes sont respectivement 1,2 entre pH 5 et 5,8 et 0,2 au dessus de pH 5,8. La variation de K_m dans la zone de pH étudiée semble donc résulter de la superposition de deux phénomènes : (a) un effet s'exerçant sur toute l'étendue de la zone de pH avec une pente faible ($\Delta pK_m/\Delta pH \simeq 0,2$) ; il s'agirait donc d'une action indirecte des ions hydrogène qui pourrait résulter d'une modification de forme de la

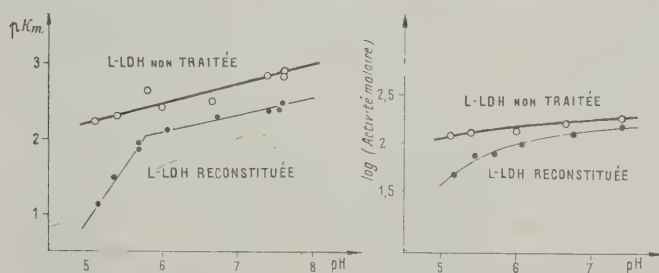


FIG. 11. — Réduction du ferricyanure par le L-lactate en présence de L-LDH non traitée ou reconstituée : effet du pH sur K_m (L-lactate) et V .

Composition du mélange réactionnel : tampon phosphate 66 mM, EDTA 16 μ M, ferricyanure 0,66 mM, L-lactate variable, pH variable obtenu par mélange de solutions de KH_2PO_4 et Na_2HPO_4 . Température 30°. Ce mélange est additionné de FMN à la concentration finale 20 μ M pour la mesure des vitesses de la réaction catalysée par la L-LDH reconstituée. La réaction est déclenchée par addition d'aliqotes de L-LDH non traitée ou d'Apo-L-LDH dans les cuves de mesure.

Calcul de K_m (L-lactate) et de V : pour chaque valeur du pH, à partir des vitesses v de la réaction mesurées pour huit concentrations différentes de L-lactate, les valeurs de K_m et V étant déterminées par la représentation classique $1/v = f(1/(L-lactate))$. Les vitesses maximales V sont exprimées en activité molaire par hème (sec^{-1}), soit (AM). Représentation graphique : en ordonnées, les valeurs de pK_m ($-\log K_m$) à gauche, ou les valeurs de $\log(AM)$ à droite ; en abscisses, les valeurs moyennes du pH pour chaque série de huit cuves mesurées après réaction (l'écart de pH avec la moyenne, pour une série, est inférieure ou au plus égale à 0,06 unités de pH).

protéine ou d'une influence globale des charges au voisinage du site actif — (b) entre pH 5,0 et 5,8 la valeur K_m est liée directement à la dissociation d'un proton porté par un groupe de pK apparent 5,8. Cette ionisation n'est pas due au substrat dont le pK est 3,9. Au dessus de pH 5,8, ce proton étant formé, la constante de Michaelis prend une valeur minimale et n'est plus directement dépendante de l'ionisation éventuelle d'autres groupes. Dans le cas de la L-LDH non traitée, on n'observe qu'un effet indirect du pH dans cette même zone ($\Delta pK_m/\Delta pH \simeq 0,2$). Toutefois, quelques expériences préliminaires faites dans un tampon pyrophosphate entre pH 4 et 5 semblent montrer une

augmentation importante de K_m en même temps que l'apparition de cinétiques du premier ordre dans le temps correspondant à une inactivation progressive contre laquelle le substrat exerce un effet protecteur (Figure 10). Il ne nous a pas été possible d'établir ce fait avec certitude puisque nous ne disposons pas de tampons convenables en dessous de pH 5, les acides carboxyliques étant des inhibiteurs de la L-LDH [6, 7].

3°) Inhibition par le D-lactate et l'oxalate.

Le pouvoir inhibiteur du D-lactate sur la L-LDH n'a pas toujours été reconnu dans les différents laboratoires. DIKSTEIN [6] semble être le premier à l'avoir observé sur des préparations peu purifiées de l'enzyme. Il n'a été analysé en détail que récemment, notre travail et ceux de HINKSON et MAHLER [8] et de SOMLO [9] montrent sans am-

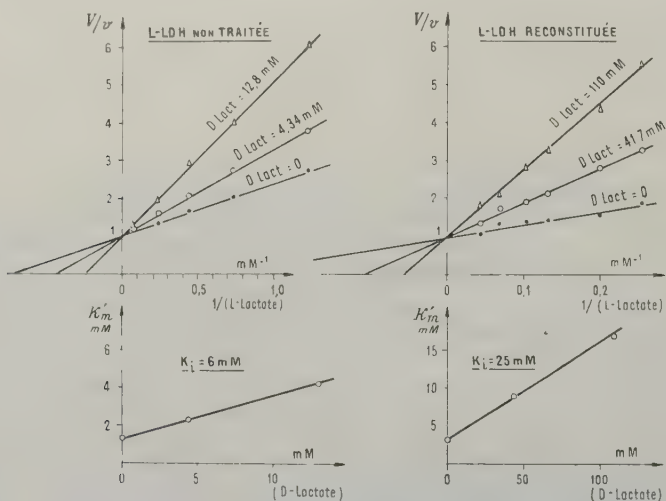


FIG. 12. — Inhibition des L-LDH non traitée et reconstituée par le D-lactate : Caractère compétitif de cette inhibition et détermination de K_i .

Composition du mélange réactionnel : tampon phosphate 66 mM, EDTA 13 μM , ferricyanure 0,66 mM, L-lactate variable, D-lactate aux concentrations indiquées sur la figure ; pH 7,6 ; 30°. Ce mélange est additionné de FMN à la concentration finale 23 μM pour les mesures des vitesses de la réaction catalysée par la L-LDH reconstituée. Réaction déclenchée par addition d'aliqotes de L-LDH ou d'Apo-L-LDH dans les cuves de mesure.

Pour une série de concentrations variées de L-lactate, on mesure la vitesse v de réduction du ferricyanure en présence de trois concentrations de D-lactate. Les vitesses maximales V sont déterminées par la représentation graphique $1/v = f(1/L\text{-lactate})$. Les résultats exprimés sous la forme $V/v = f(1/L\text{-lactate})$ montrent le caractère compétitif de cette inhibition et donnent les valeurs des constantes de Michaelis apparentes K'_m . Le graphique classique représentant les variations de K'_m en fonction des concentrations de l'inhibiteur (D-lactate) permet de déterminer les valeurs des constantes d'inhibition K_i .

biguité que le D-lactate exerce sur la L-LDH une inhibition de type compétitif avec le substrat.

Nous avons étudié ce phénomène par la méthode classique, en mesurant la vitesse de réduction du ferricyanure pour des concentrations variables de L-lactate (voisines de la valeur de K_m) en présence de D-lactate. Pour les deux formes de la L-LDH, la vitesse maximale V n'est pas affectée par le D-lactate, tandis que la constante de Michaelis apparente relative au L-lactate K_m croît linéairement avec la concentration de l'inhibiteur (Figure 12). Les valeurs des constantes d'inhibition relatives au D-lactate K_i sont indépendantes du pH entre les valeurs 5,8 et 7,6. Pour la L-LDH non traitée les valeurs suivantes de K_i ont été obtenues : $K_i = 5,5 \pm 1\text{mM}$ et $6,0 \pm 0,5\text{ mM}$ à pH 7,6 et $K_i = 6,5 \pm 0,5\text{ mM}$ à pH 5,8 ; ces valeurs sont en excellent accord avec celles des autres auteurs soit $K_i = 6,1\text{mM}$ entre pH 5,5 et pH 8,5 [8] et $K_i = 6,6 \pm 1,4\text{ mM}$ à pH 7,3 [9]. L'affinité de la L-LDH reconstituée pour le D-lactate est notablement plus faible que celle de l'enzyme non traité ; la valeur la plus précise que nous avons obtenue est $K_i = 25 \pm 5\text{mM}$ à pH 7,6. Quelques déterminations moins précises (utilisant deux concentrations faibles de L-lactate, 2 et 5 mM, et

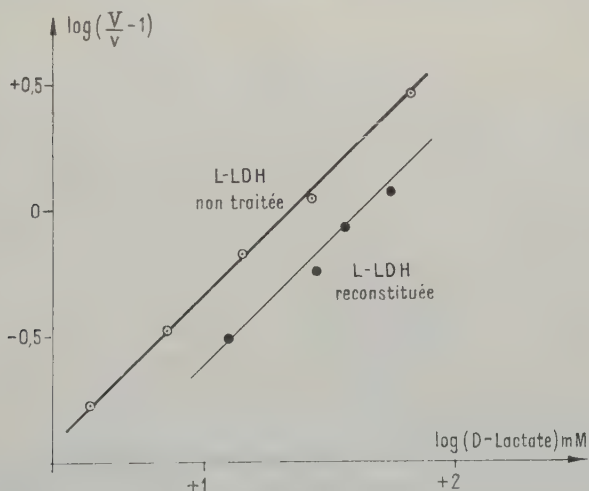


FIG. 13. — Inhibition des L-LDH non traitée et reconstituée par le D-lactate : détermination du nombre de molécules d'inhibiteur fixées par site actif.

Conditions expérimentales identiques à celles de la figure 12. On mesure la vitesse de réduction du ferricyanure par le L-lactate aux concentrations respectives 2 mM pour la L-LDH non traitée et 1,15 mM pour la L-LDH reconstituée. En présence d'inhibiteur, on obtient les vitesses v pour différentes concentrations de D-lactate, et en absence d'inhibiteur les vitesses V . La représentation de BERGMAN et SEGAL [10] $\log(V/v - 1) = f(\log(i))$ est une droite dont la pente est égale au nombre n de molécules d'inhibiteur fixées par site actif de l'enzyme. Pour les deux formes de la L-LDH, $n = 1$ pour le D-lactate.

des concentrations variables de 0 à 70 mM de D-lactate) ont donné les valeurs suivantes : $K_i = 35 \pm 10$ mM (moyenne de deux déterminations à pH 7,6) et $K_i = 40 \pm 10$ mM (moyenne de deux déterminations à pH 6,0).

La représentation graphique de BERGMAN et SEGAL [10] montre que cette inhibition compétitive met en jeu, comme dans le cas des acides carboxyliques [6, 7], la fixation d'une seule molécule de D-lactate par site actif de la L-LDH native ou reconstituée (Figure 13).

L'effet inhibiteur de l'oxalate sur les lacticodéshydrogénases de la levure a été observé par BERNHEIM dès 1928 [11] puis par NYGAARD [7]. L'étude précise de cette inhibition par SOMLO [9] et nous-même a montré que l'oxalate est un inhibiteur compétitif avec le substrat pour la L-LDH. La valeur de la constante d'inhibition dépend beaucoup du pH tant pour la L-LDH non traitée que pour la L-LDH reconstituée ; les valeurs suivantes ont été obtenues : $K_i = 2$ mM à pH 7,6 et 0,022 mM à pH 5,5 pour la L-LDH non traitée et $K_i = 5 \pm 1$ mM à pH 7,6 et 0,8 mM à pH 6,1 pour la L-LDH reconstituée. Par conséquent, l'affinité de ce dernier pour l'oxalate aussi bien que pour le D-lactate est sensiblement plus faible que celle de la L-LDH non traitée ; cette observation est probablement valable pour les autres inhibiteurs compétitifs.

DISCUSSION.

Le fait qu'il nous a été possible d'obtenir, après dissociation de la flavine de la L-LDH, une Apo—L-LDH spécifiquement réactivable à des taux élevés par FMN, nous a permis d'entreprendre l'étude du mode de liaison de ce groupe prosthétique à l'enzyme.

Le présent travail se limite à une étude de la constante d'équilibre dans différentes conditions permettant d'analyser : (1) la compétition entre FMN d'une part et riboflavine, phosphate et pyrophosphate d'autre part ; (2) la coopération entre FMN et un inhibiteur compétitif avec le substrat, l'oxalate. L'ensemble des résultats que nous allons discuter permet d'apporter quelques informations sur la nature de la liaison de la flavine prosthétique à la protéine.

Pour déterminer les valeurs de la constante d'équilibre, nous avons utilisé deux méthodes reposant sur des principes différents : la première, purement cinétique, est la détermination de la concentration de flavine dans le milieu d'essai standard de l'activité, donnant la demi-vitesse maximale pour l'Apo—L-LDH, soit K_{FMN} ; la seconde repose sur une méthode de dilution du mélange Apo—L-LDH + FMN, longuement décrite et justifiée dans le texte, et aboutit à la détermination de la valeur de la constante de dissociation K .

A priori, il semblait probable que les deux méthodes aboutiraient à des résultats différents. La raison principale en est que le milieu

et l'état de l'enzyme ne sont pas identiques dans les deux cas. Dans la détermination de K_{FMN} , l'enzyme en présence de substrat et d'accepteur est sous une forme moléculaire actuellement mal définie qui varie cycliquement ; dans ces conditions il n'est pas certain qu'un équilibre entre les formes libre et fixée sur l'enzyme du FMN oxydé soit réellement établi, une partie de la flavine fixée étant vraisemblablement réduite. Dans la détermination de K , tout au moins en absence de L-lactate, les conditions d'équilibre sont effectivement réalisées et les valeurs obtenues semblent devoir être correctes. En fait, comme le montre le Tableau II, on constate que pour un milieu salin identique, les valeurs de K_{FMN} et de K sont pratiquement égales.

TABLEAU II.

Valeurs de la constante apparente d'affinité de l'Apo—L-LDH pour le FMN, obtenues par trois méthodes indépendantes.

	Méthode cinétique K_{FMN}	Méthode de dilution K'	Méthode fluorimétrique K' [3]
Tampon Tris/HCl	0,11 $\pm$ 0,02 μ M (30°) Tris/HCl 50 mM	—	0,07 μ M 0,22 μ M (*) (23°) Tris/HCl 100 mM
Tampon Phosphate	1 à 2 μ M (30°) Phosphate 0,1 M + Tris/HCl 50 mM	2 $\pm$ 0,5 μ M (*) 3,1 μ M (0°) (30°) Phosphate 0,1 M	2,2 μ M (*) (23°) Phosphate 40 mM
K_i Phosphate	14 mM	—	12 à 15 mM (1)

Comparaison des valeurs de l'affinité apparente de l'Apo-L-LDH pour le FMN obtenues comme il est décrit dans cet article avec les valeurs obtenues par IWATSUBO et DI FRANCO [3] par une méthode fluorimétrique.

Les valeurs notées (*) concernent l'Apo-L-LDH_{brute} (cf. Tableau I) ; les autres, l'Apo-L-LDH_{Sephadex} (cf. partie technique).

(1) IWATSUBO et DI FRANCO : résultats non publiés.

La variation des valeurs de K_{FMN} en présence de riboflavine, phosphate et pyrophosphate, montre qu'il n'y a pas de compétition entre la riboflavine et le FMN lors de la fixation de ce dernier sur l'Apo—L-LDH, mais qu'il existe une compétition entre le phosphate ou le pyrophosphate et le FMN. L'analyse de cette compétition indique que *le résidu phosphoryl de la flavine intervient dans la fixation de ce groupe prosthétique sur la protéine*. Cette participation est sans doute générale pour les enzymes flaviniques puisque, mise en évidence par le travail fondamental de THEORELL et NYGAARD pour l'ancien ferment jaune (NADPH₂ Diaphorase) [12], il a également été observé pour la fixation du FAD sur l'Apo—D-Amino-acide oxydase [13].

Cependant, le résidu phosphoryl ne semble participer que pour une part minime à l'ensemble de la liaison de la flavine ; en effet, l'affinité des ions phosphate et pyrophosphate (respectivement 14 et 8 mM) est relativement très faible par rapport à l'affinité apparente de la flavine pour la protéine (K_{FMN} et K environ 0,10 μ M dans le tampon Tris/HCl 50 mM). D'autres liaisons interviennent sans doute dans la fixation du FMN ; en particulier, le phénomène d'extinction totale de fluorescence qui l'accompagne [3] est généralement interprété comme l'indice d'une liaison du noyau isoalloxanine en —N(3). Pourtant la riboflavine elle-même n'entre pas en compétition avec le FMN, même à des concentrations plusieurs centaines de fois plus grandes que celles du FMN. *Il est donc vraisemblable qu'il y a un effet coopératif entre les groupes phosphoryl et isoalloxazine pour la fixation globale du FMN sur l'enzyme* ; un tel phénomène a été observé par THEORELL et NYGAARD pour la NADPH₂ diaphorase [14].

L'étude des variations du K expérimental (K') en présence d'oxalate a mis en évidence un effet important de cet inhibiteur compétitif qui stabilise la liaison flavoprotéique. On sait que ce type d'expériences permet théoriquement [15, 16, 17] de déterminer d'une part l'énergie de stabilisation apportée par l'effecteur, d'autre part, la valeur de la constante de dissociation du complexe enzyme-effecteur.

La valeur de la concentration d'oxalate donnant un demi-effet sur la variation de K' , soit 6 mM, est très voisine de celle de la constante d'inhibition, soit K_i 10 mM, mesurée dans les mêmes conditions ; la stabilisation du complexe flavoprotéique est donc vraisemblablement liée à la formation du même complexe L-LDH - Oxalate.

Avec le L-lactate, on observe apparemment le même effet qu'avec l'oxalate : la constante apparente K' diminue lorsque la concentration de ce substrat augmente. Cependant, l'interprétation du phénomène est alors imbriguée car deux possibilités doivent être envisagées : (1) l'effet observé résulte de la formation du complexe L-LDH - L-lactate ou (2) il résulte simplement de la réduction par le lactate du FMN fixé sur l'enzyme. Le deuxième cas est le moins intéressant puisqu'il est bien connu que l'énergie de la liaison flavoprotéique est très souvent plus grande lorsque la flavine se trouve à l'état réduit. Ne connaissant pas l'état d'oxydo-réduction du FMN de l'enzyme dans les conditions expérimentales utilisées, il ne nous a pas été possible de trancher et, par conséquent, de trouver la signification de la constante de demi-effet du L-lactate ; il faut signaler toutefois que cette valeur est très inférieure à celle de la constante de Michaelis de l'enzyme pour ce même substrat.

Malgré cette restriction, il nous semble établi qu'il s'agit bien d'une *interaction entre les sites récepteurs du substrat et de la flavine* puisque nous avons pu montrer la *réciprocité* de ce phénomène. En effet, l'affinité apparente de la L-LDH reconstituée pour le L-lactate

(inversement proportionnelle à K_m (L-lactate)) tend vers une valeur maximale lorsque l'Apo—L-LDH est saturée en flavine.

La stabilisation du complexe Apo—L-LDH-FMN par le L-lactate et l'oxalate, aussi bien que l'effet de divers anions dont le phosphate et le pyrophosphate, ont été également étudiés par IWATSUBO et DI FRANCO dans un travail parallèle par une méthode fluorimétrique [3]. Ces auteurs ont pu ainsi mesurer à la fois les vitesses d'association et de dissociation de la flavine en présence d'Apo-L-LDH et la constante de stabilité du complexe flavoprotéique. Ils ont montré que le substrat et l'oxalate exercent leur effet coopératif pour la fixation du FMN aussi bien dans le tampon Tris que dans le tampon phosphate ; par conséquent, cette stabilisation du complexe Apo—L-LDH—FMN ne résulte pas de la levée de l'effet des ions phosphate qui, comme nous l'avons montré, favorisent la dissociation du complexe flavoprotéique.

Un phénomène d'interaction entre substrat et flavine prosthétique a déjà été étudié par IWATSUBO et LABEYRIE sur la D-LDH [17] ; ils ont observé une protection partielle apportée par le D-lactate et une protection complète par le FAD vis-à-vis de l'inactivation progressive de cet enzyme par la quinacrine qui se fixe alors sur le site récepteur de la flavine. Nous suggérons que, là aussi, le substrat agit en augmentant l'affinité de la protéine pour la flavine comme nous l'avons montré pour la L-LDH.

En raison de la stricte stéréospécificité de la L-LDH, on doit admettre que le substrat se fixe par plusieurs points d'attache à la surface de la L-LDH. Pour expliquer le phénomène d'interaction que nous avons observé entre les sites récepteurs du substrat et de la flavine, on peut envisager deux hypothèses :

(1) les deux sites sont à proximité immédiate dans l'architecture tertiaire de la molécule, il pourrait s'établir une liaison entre la flavine et le substrat ;

(2) les deux sites sont distants et l'interaction est indirecte, puisque, comme WURMSER l'a fait remarquer dans un cadre plus général [18], la fixation d'une molécule d'effecteur pourrait éventuellement entraîner un changement de structure de la protéine et, de ce fait, modifier l'affinité d'autres sites pour leurs propres effecteurs.

Il n'est pas possible actuellement de choisir entre ces deux alternatives. Aucun élément décisif ne permet de savoir si la fixation du substrat met en jeu réellement l'établissement d'une liaison avec le FMN selon l'hypothèse déjà ancienne de DIKSTEIN [6]. Pour répondre à cette question, il sera très important de savoir si l'Apo—L-LDH est capable ou non de fixer le L-lactate ou les inhibiteurs compétitifs. Nos expériences cinétiques d'étude de la variation de K'_m (L-lactate) avec la concentration de flavine n'ont pas apporté de réponse à cette question, l'instabilité de l'Apo—L-LDH ne permettant pas, pour les très faibles concentrations de FMN, de savoir si la valeur de K'_m

(L-lactate) tend vers une valeur finie ou infinie. D'autres méthodes, comme l'équilibre de dialyse, pourront être utilisées.

D'autre part, il conviendra d'entreprendre l'étude des changements de structure qui pourraient accompagner la dissociation et la réassociation de la flavine sur l'Apo—L-LDH. Quelques indices suggèrent que de telles modifications interviennent : il est apparu lors de la cristallisation de la L-LDH reconstituée [2] que la saturation de l'Apo—L-LDH par le FMN modifie la solubilité de l'hémoprotéine ; enfin IWATSUBO et DI FRANCO [3] ont observé une grande variation d'entropie lorsque la combinaison de l'Apo—L-LDH avec le FMN est réalisée en présence d'ions carboxyliques.

La séparation de groupes prosthétiques fortement liés aux protéines enzymatiques (flavines, cytochromes...) met en jeu le plus souvent des traitements sévères qui s'accompagnent de modifications irréversibles de la structure protéique. Notre étude comparée des propriétés cinétiques des L-LDH non traitée et reconstituée (Apo—L-LDH + FMN saturant) a pour but de tenter d'estimer l'importance de ces changements.

Comme le montre le Tableau III, les différences observées traduisent une diminution générale et relativement peu importante de l'affinité

TABLEAU III.
Caractères comparés des L-LDH non traitée et reconstituée.

	K_m L-lactate	K_i D-lactate	K_i Oxalate	K_{FMN}
L-LDH non traitée	1 mM	6 mM	2 mM	10^{-4} μ M (1)
L-LDH reconstituée	4 mM	25 mM	5 mM	0,11 μ M (2) 1 à 3 μ M (3)

Les valeurs des constantes cinétiques suivantes : K_m (L-lactate), K_i (D-lactate) et K_i (Oxalate) ont été déterminées à pH 7,6 et à 30° comme il est décrit dans la partie consacrée aux résultats expérimentaux.

Les valeurs de K_{FMN} ont été mesurées dans les conditions suivantes :

- (1) méthode fluorimétrique, valeur obtenue par IWATSUBO et DI FRANCO [3].
- (2) Valeur de la constante de demi-saturation à pH 7,3 et 30°, dans le tampon Tris/Chlorure, obtenue par la méthode cinétique.
- (3) Valeurs de la constante de demi-saturation (méthode cinétique) et de la constante de dissociation du complexe Apo-L-LDH - FMN (méthode de dilution) à pH 7,3-7,4 en présence de phosphate 0,1M.

apparente de l'enzyme reconstitué pour le substrat et les inhibiteurs compétitifs et, simultanément, une diminution très importante de l'affinité de l'hémoprotéine pour la flavine. Il est tentant de penser que *ces phénomènes ne sont pas indépendants*, les modifications d'affinité qui concernent le site récepteur du substrat pouvant en réalité être

une conséquence de la labilisation des liaisons de la flavine à la protéine.

Ces constatations nous conduisent à envisager d'une manière plus générale le problème des relations entre des modifications éventuelles de la structure protéique et les propriétés cinétiques et physicochimiques de la L-LDH. Nous aborderons les deux points suivants : d'une part existe-t-il une forme « physiologique » de la L-LDH dont les propriétés seraient différentes de celles de l'enzyme cristallisé ? D'autre part, peut-on mettre en évidence des variations des propriétés de cet enzyme entre des souches de levure définies génétiquement ?

Le premier problème a été soulevé par SOMLO et SLONIMSKI [19] qui ont observé que les extraits bruts de L-LDH présentent des propriétés différentes de celles de nos échantillons cristallisés. Ces différences qui portent sur les affinités apparentes de l'enzyme pour le L-lactate et les inhibiteurs compétitifs ainsi qu'un effet d'inhibition par excès de substrat pour la L-LDH « physiologique », n'apparaissent au cours de la purification qu'après le stade de cristallisation. Il semble qu'il s'agit d'une modification brutale lors de ce processus et non pas d'une sélection entre deux formes moléculaires de l'enzyme. Toutefois, il convient de rappeler que la quantité de cristaux qu'on peut obtenir par la méthode d'APPLEBY et MORTON ne représente qu'environ 20 p. 100 de la quantité de L-LDH extractible de la levure.

En ce qui concerne l'aspect génétique du déterminisme des propriétés enzymatiques de la L-LDH, on ne dispose actuellement que de très rares informations. Dans un travail préliminaire, CLERTANT [20] a comparé quelques propriétés (groupes prosthétiques, activité molaire, caractéristiques spectrales) d'échantillons de L-LDH cristallisée après extraction à partir de la levure commerciale (Springer) et d'une souche sélectionnée et cultivée au laboratoire. Ce travail n'a fait apparaître aucune différence significative entre les deux types d'échantillons.

TROISIÈME PARTIE.

ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE L'OXYDORÉDUCTION DES GROUPES PROSTHÉTIQUES FLAVINIQUE ET CYTOCHROMIQUE.

INTRODUCTION.

La L-lactico-déshydrogénase de la levure de boulangerie (L-lactate : cytochrome C oxydo-réductase EC 1.1.2.3.) est un enzyme d'oxydo-réduction qui possède deux groupes prosthétiques : le FMN et le protohème. Cette particularité très rare a été mise en évidence par APPLEBY et MORTON [1] qui, les premiers, ont cristallisé cet enzyme et par BOERI et al. [2] sur des préparations pures non cristallisées. Ces deux groupes prosthétiques sont présents dans la L-LDH à raison d'une mole de FMN et une mole d'hème pour environ 82.000 g d'enzyme [3] ; toutefois, l'unité moléculaire reconnue par des méthodes hydrodynamiques correspondrait à un poids moléculaire de 183.000 [3].

Bien que cet enzyme ait été l'objet de nombreux travaux, le problème fondamental de son mécanisme de fonctionnement et en particulier l'interprétation du rôle respectif de chacun des deux groupes prosthétiques, n'avaient pu être abordés que par l'analyse des caractéristiques cinétiques de la réaction catalysée (pour références voir [4]).

La possibilité de séparer le FMN de l'enzyme par un traitement au sulfate d'ammonium acide qui fournit un apoenzyme réactivable par FMN [4, 5] nous a permis d'entreprendre une étude plus directe des propriétés des deux groupes prosthétiques de la L-LDH. Dans un article précédent [4], nous avons montré, par l'étude des propriétés de l'Apo—L-LDH (hémoprotéine), que la flavine est essentielle aussi bien pour l'activité enzymatique que pour le transfert des électrons provenant du lactate au constituant cytochromique de l'enzyme. Dans le présent article, après avoir montré que la flavine de l'enzyme, tout comme le cytochrome, est bien réduite par le substrat, nous présenterons une étude des propriétés d'oxydoréduction des deux groupes prosthétiques.

Très tôt, BACH et ses collaborateurs [6, 7] avaient observé que l'addition de lactate aux solutions de la L-LDH provoquait une modification spectrale du composant cytochromique, typique d'un processus de réduction. Cette propriété a déjà été utilisée pour suivre la réduction de l'hème au cours de titrages de la L-LDH par le lactate : les résultats obtenus par BOERI et CUTOLO [8] et par CHANCE et al. [9] présentent des différences importantes qui seront analysées dans notre discussion.

La réduction de la flavine de la L-LDH par le substrat est implicitement admise par les différents auteurs, mais, mise à part la tentative de HASEGAWA et OGURA [10] que nous discuterons plus loin, aucune preuve décisive n'a été apportée de ce phénomène. Deux raisons s'opposent en effet à sa mise en évidence : d'une part, le FMN fixé à l'enzyme n'est pas fluorescent même à l'état oxydé [1] et d'autre part le spectre d'absorption de la flavine est masqué par la composante cytochromique très intense.

Des deux groupes prosthétiques, seul le constituant cytochromique a été étudié du point de vue de son potentiel d'oxydoréduction. Une détermination électrométrique de BOERI et CUTOLO [11] donnait pour le potentiel de demi-réduction la valeur + 220 mV tandis que HASEGAWA et OGURA [10] avaient obtenu la valeur + 120 mV par l'étude spectrophotométrique de l'équilibre entre le cytochrome et le Bleu de Tolylène.

Les désaccords importants entre les résultats obtenus dans les différents laboratoires sur des préparations plus ou moins purifiées de L-LDH ont rendu nécessaire une étude de la distribution des électrons provenant du lactate entre les groupes prosthétiques de l'enzyme cristallisé. Dans cet article, nous décrivons le comportement électronique de la L-LDH tant du point de vue du nombre des électrons mis en jeu dans la réduction de chacun des deux groupes prosthétiques que de celui de leur potentiel d'oxydoréduction. Ce travail est basé sur une mesure spectrophotométrique du taux de réduction du cytochrome (à 557 m μ) et de la flavine (à 480 m μ) au cours d'un titrage de l'enzyme oxydé par le L-lactate. Pour exploiter les résultats, il faut disposer d'un moyen d'estimer la part revenant au cytochrome dans l'extinction de la L-LDH à 480 m μ . Ceci nous a été possible grâce à la comparaison du spectre de la L-LDH avec celui de l'Apo—L-LDH obtenue par séparation quantitative du FMN [4, 5] : le spectre différentiel des produits oxydés, L-LDH (flavohémoprotéine) moins Apo—L-LDH (hémoprotéine), montre le spectre du FMN fixé sur la L-LDH. Le fait que ce spectre s'annule en présence de lactate démontre la réduction du FMN par le substrat. Ces données permettent par conséquent de calculer les extinctions respectives des composants cytochromique et flavinique à l'état réduit et oxydé aux différentes longueurs d'onde.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

1°) Préparation de la L-LDH et de l'Apo—L-LDH (apoenzyme sans flavine) :

La L-LDH est obtenue à l'état cristallisé par la méthode d'APPLEBY et MORTON [1]. Les cristaux réduits sont dissous dans le tampon phosphate 0,1 M, EDTA 1mM, pH 7,2 - 7,3 à 0° ; la solution est agitée à l'air libre jusqu'à oxydation complète puis centrifugée. La concentration des solutions est mesurée spectrophotométriquement en utilisant les extinctions molaires (par mole d'hème) données par APPLEBY et MORTON [12] pour l'enzyme recristallisé à l'état réduit : $38,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 557 m μ ou $232 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 424 m μ .

L'Apo—L-LDH, réactivable par le FMN (50 à 80 p. 100 de l'activité molaire initiale), est préparée selon la technique précédemment décrite [4, 5] par précipitation de la L-LDH au sulfate d'ammonium acide (pH $\approx$ 2). La solution brute de l'Apo—L-LDH est passée sur colonne de Sephadex G 25 pour éliminer la flavine qui la contamine [4].

2°) Solutions de L-lactate et de Bleu de Méthylène :

Les solutions de L-lactate de sodium sont préparées à partir du L-lactate de calcium (California Corp. for Biochem. Research) selon la méthode précédemment décrite [4] et dosées enzymatiquement par la technique de LABEYRIE et al. [13].

Le Bleu de Méthylène (RAL pour bactériologie) utilisé comme indicateur d'oxydoréduction, est mis en solution dans le même tampon que la L-LDH. Deux titrages électrométriques de cet échantillon ont donné les valeurs suivantes pour le potentiel de demi-réduction à pH 7,0 : + 30 mV à 9° et + 13 mV à 25°, soit par extrapolation linéaire ($\Delta E_{m7} = - 1,1 \text{ mV}$ par degré) + 8 mV à 30°, valeur en accord satisfaisant avec la valeur de CLARK et al. [14].

3°) Mesure des pH :

Les valeurs du pH des solutions titrées (enzyme ou colorant témoin), ont été mesurées en fin d'expérience avec l'électrode à hydrogène. Ces mesures sont faites à la température des titrages en constituant un pile avec une électrode au calomel saturé maintenue à cette même température au moins 48 heures à l'avance. Les solutions tampon étalon utilisées sont : phthalate acide de potassium 50 mM et borax 10 mM (sels recristallisés) pour lesquelles les valeurs du NATIONAL BUREAU OF STANDARDS ont été adoptées [15].

4°) Titrage de la L-LDH par le L-lactate :

La L-LDH oxydée (recristallisée une fois), en solution dans le tampon phosphate 0,1 M, EDTA 1 mM, pH $\approx$ 7,3, est contenue dans une cuve spectrophotométrique de type Thunberg (trajet optique 1 cm) à embouchure rodée (n° 2 normalisée) fermée par un bouchon de poly-

thène correspondant au rodage. La solution titrée de L-lactate est ajoutée à l'aide d'une microseringue AGLA dont l'embout est prolongé par une courte aiguille métallique sur laquelle est adapté un tube de nylon très fin (microtube pour chromatographie gazeuse) qui traverse le bouchon de la cuve spectrophotométrique.

La désoxygénation complète des solutions est obtenue par barbotage d'azote R purifié des traces d'oxygène qu'il contient par passage sur une colonne de sulfate de vanadyle et lavé sur colonne d'eau bidistillée. L'arrivée d'azote dans la cuve spectrophotométrique est assurée par un trocard (l = 8 cm, diamètre = 0,7 mm) traversant le bouchon et prolongé par un morceau de microtubé de nylon pour éviter le contact du métal avec la solution. L'extrémité du microtube est amenée au dessus du niveau de la solution pendant les mesures ou introduite dans celle-ci après chaque addition de lactate pour en assurer le mélange.

Après chaque addition de lactate, on mesure l'extinction de la solution aux longueurs d'onde 665, 557, et 480 m μ avec le spectrophotomètre Beckman DU possédant un compartiment à cuves thermostaté. Les titrages sont effectués à basse température (environ 5°) pour éviter la dénaturation de l'enzyme pendant la durée des expériences (environ une heure).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

1°) Etude spectrale du FMN fixé sur la L-LDH :

Le spectre d'absorption de la L-LDH recristallisée, à l'état oxydé, montre, outre les bandes cytochromiques, deux épaulements bien marqués à 450 et 480 m μ (Figure 1). Après réduction par le lactate, en absence d'oxygène, l'extinction diminue considérablement et varie peu entre 450 et 500 m μ . Comme APPLEBY et MORTON l'ont déjà fait remarquer [12], ces caractéristiques suggèrent qu'une partie de ces modifications spectrales est due au groupe flavinique de la L-LDH. Toutefois, le spectre de la flavine fixée ne peut être établi par spectrophotométrie directe ou différentielle (L-LDH oxydée moins L-LDH réduite) en raison de la proximité de la bande γ du cytochrome dont l'extinction est très élevée (L-LDH réduite à 424 m μ : $\epsilon = 232 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

L'Apo—L-LDH préparée comme il est indiqué précédemment, qui ne contient que de 0,1 à 1 p. 100 de flavine, présente le même spectre cytochromique que la L-LDH initiale [4]. On peut mettre en évidence le spectre du FMN fixé sur cette dernière par spectrophotométrie différentielle (L-LDH moins Apo—L-LDH). Un tel spectre (Figure 2) présente en effet deux bandes d'absorption situées à 375 et 455 m μ . On peut observer la disparition rapide de ces bandes par addition de lactate, prouvant ainsi la réduction du FMN par ce substrat : le spectre différentiel L-LDH réduite par le L-lactate moins Apo—L-LDH réduite

(par le lactate ou le dithionite) ne présente pas les bandes observées dans le spectre différentiel des produits oxydés. Cette expérience ne permet toutefois pas de dire s'il s'agit d'une réduction complète de la flavine ou d'une réduction à l'état de semi-quinone comme certains auteurs le pensent.

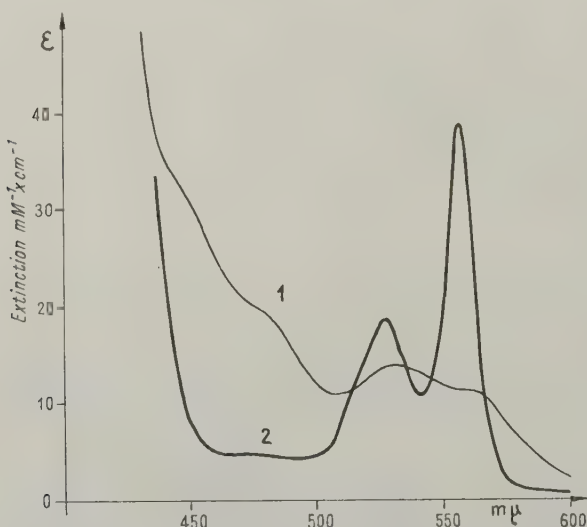


FIG. 1. — Spectre de la L-LDH oxydée et réduite de 450 à 600 mμ.

L-LDH (recristallisée une fois) en solution 19,5 μM (d'hème) dans le tampon phosphate 0,1 M, EDTA 20 μM, pH 7,3, placée dans une cuve de type Thunberg, dégazée sous vide puis placée sous atmosphère d'azote « R ».

1. L-LDH oxydée par l'oxygène atmosphérique.

2. L-LDH réduite par DL-lactate 23 mM.

Extinctions molaires calculées à partir de $\epsilon = 38,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 557 mμ pour la solution réduite [12].

Il ne nous a pas été possible de définir le spectre de la flavine fixée dans la région de 270 mμ puisqu'une partie du polydésoxyribonucléotide associé à la L-LDH cristallisée [1, 16, 17, 18] se trouve détachée au cours de la préparation de l'Apo—L-LDH [4] et perturbe ainsi le spectre dans l'ultraviolet.

L'extinction molaire du FMN fixé sur la L-LDH, comme on peut la calculer d'après les spectres différentiels (Figure 2) est $11,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 455 mμ. On peut apprécier l'erreur relative à 5 p. 100 ; celle-ci étant due en partie au fait que pour tracer le spectre différentiel des produits oxydés, on a ajusté les extinctions à 413 mμ des deux solutions au lieu d'ajuster exactement les concentrations ; on a négligé ainsi la participation de la flavine (environ 3 p. 100) à l'absorption totale de la L-LDH à cette longueur d'onde. L'extinction molaire du FMN fixé,

à l'état oxydé, semble donc pratiquement égale, peut être légèrement inférieure à celle du FMN libre qui est : $12,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à $445 \text{ m}\mu$ [19].

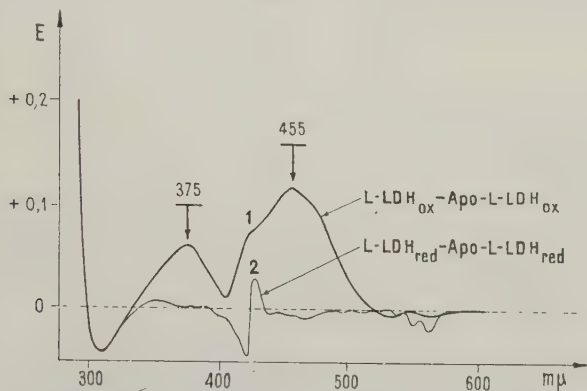


FIG. 2. — Spectre du FMN fixé sur la L-LDH : spectre différentiel de la L-LDH par rapport à l'Apo—L-LDH.

Deux microcuvettes (trajet optique 1 cm, volume de la solution environ 1 ml) contiennent : l'une la solution de L-LDH (cristallisée une fois), l'autre la solution d'Apo—L-LDH, toutes deux dans le tampon phosphate 0,1 M, EDTA $20 \mu\text{M}$ pH 7,3. On égalise par dilution fine les extinctions des solutions oxydées à $413 \text{ m}\mu$; les concentrations finales de L-LDH et d'Apo—L-LDH sont alors $10,0 \mu\text{M}$ (en hème) et on protège de l'air par une couche d'huile de paraffine.

Spectres enregistrés au spectrophotomètre Cary 15 :

1. Spectre différentiel oxydé : solution de L-LDH (cuve de mesure) et solution d'Apo—L-LDH (cuve de référence) préparées comme ci-dessus.

2. Spectre différentiel réduit : on ajoute dans chacune des deux cuves une prise identique de L-lactate (concentration finale 11 mM) les concentrations de L-LDH et d'Apo—L-LDH deviennent de ce fait $9,9 \mu\text{M}$.

Remarques. — Les bandes flaviniques (375 et $455 \text{ m}\mu$) du spectre différentiel oxydé disparaissent immédiatement après l'addition du lactate ; la réduction du cytochrome de la L-LDH est également immédiate, mais celle du cytochrome de l'Apo—L-LDH, catalysée par les traces de L-LDH résiduelle, est très lente [4]. Il faut attendre environ 30 minutes après l'addition du lactate pour tracer le spectre différentiel réduit. Lorsque l'Apo—L-LDH est réduite par le dithionite, l'équilibre entre les deux cuves est immédiatement atteint. Les petits accidents visibles vers $410\text{-}420 \text{ m}\mu$ et $550\text{-}560 \text{ m}\mu$ traduisent soit une imperfection d'ajustement des concentrations, soit de très légères différences entre les caractéristiques spectrales de la L-LDH et de l'Apo—L-LDH ; en particulier, le petit accident biphasique vers $420 \text{ m}\mu$ indique un très léger déplacement du pic γ du cytochrome ($< 0,5 \text{ m}\mu$).

Connaissant le spectre du FMN fixé, nous avons pu calculer les extinctions molaires des composants cytochromique et flavinique du spectre de la L-LDH recristallisée à $480 \text{ m}\mu$ (Tableau I) ; cette longueur d'onde présente deux avantages pour l'étude spectrophotométrique du FMN de l'enzyme : (1) elle correspond à un épaulement marqué du spectre de la L-LDH-oxydée (Figure 1) ; (2) la part de la flavine dans l'extinction totale est plus grande qu'à $455 \text{ m}\mu$ (respectivement $8,3/18,9$

TABLEAU I.

Extinctions molaires des groupes prosthétiques de la L-LDH oxydée et réduite à 480 mμ (mM⁻¹ cm⁻¹).

	L-LDH ; spectre total (1)	Flavine (2)	Cytochrome (3)
Etat oxydé.....	18,9	8,3	10,6
Etat réduit (lactate).....	4,85	0,5	4,35

(1) Mesures et calculs comme indiqué Figure 1. La précision sur les valeurs des extinctions molaires est de l'ordre de 1 p. 100.

(2) Mesures et calculs comme indiqué Figure 2. La précision sur les valeurs des extinctions molaires du FMN fixé oxydé et par conséquent sur celle du cytochrome est de l'ordre de 5 p. 100.

(3) Valeurs obtenues par différence : (1) — (2).

et 11,5/28,2). Le calcul des extinctions du constituant cytochromique a été fait par différence entre les extinctions totales de la L-LDH et celles du FMN fixé en faisant l'hypothèse que ces deux composantes spectrales sont additives.

2°) *Titrage de la L-LDH oxydée par le L-lactate : répartition des électrons entre le constituant cytochromique et la flavine de l'enzyme :*

Des échantillons de L-LDH recristallisée et oxydée ont été titrés par le L-lactate en milieu strictement anoxyque.

L'absorption de la L-LDH à 557 mμ est due uniquement au groupe cytochromique (bande α) ; par conséquent, les variations de l'extinction à cette longueur d'onde permettent de calculer le pourcentage de réduction du cytochrome au cours du titrage. Les variations de l'extinction à 480 mμ concernent à la fois le cytochrome et la flavine mais la composante due au premier peut être éliminée par le calcul puisqu'on connaît pour chaque quantité de L-lactate ajoutée le taux de réduction du cytochrome et les extinctions molaires du cytochrome oxydé et réduit à 480 mμ (Tableau I). Les résultats d'une telle expérience (Figures 3 et 4) montrent :

a) au début du titrage et jusqu'à environ 50 p. 100 de réduction du cytochrome, il n'est pas possible de mettre en évidence une quantité détectable de flavine réduite à l'état stationnaire. En effet, la composante flavinique de l'absorption à 480 mμ ne diminue pas et d'autre part, la pente de la partie linéaire de la courbe de variation de l'extinction à 557 mμ correspond exactement à la valeur de l'extinction différentielle de la bande α du cytochrome ($\epsilon_{\text{red.}} - \epsilon_{\text{ox.}} = 27,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

b) dans la suite du titrage, on observe la réduction progressive du FMN en même temps que la fin de la réduction du constituant cytochromique.

c) la réduction complète des deux groupes prosthétiques est obtenue pour une quantité de L-lactate correspondant à 1,5 moles soit 3 électron-équivalents pour une quantité d'enzyme contenant une mole d'hème du cytochrome.

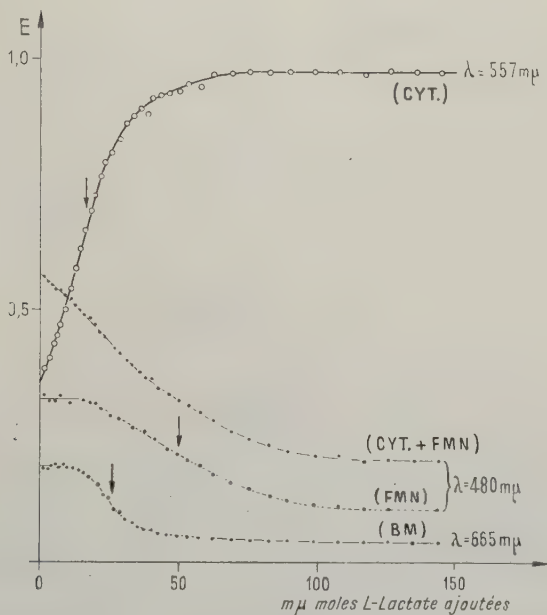


Fig. 3. — Titrage d'oxydo-réduction de la L-LDH par le L-lactate (méthode spectrophotométrique).

Un vase à titrer terminé par une cuve spectrophotométrique (trajet optique 1 cm) dans lequel circule un courant d'azote « R » purifié contient : L-LDH (deux fois cristallisée) en solution (69,2 mμ moles d'hème dans 2,75 ml) dans le tampon phosphate 0,1 M EDTA 1 mM pH 7,3 et du Bleu de Méthylène (concentration finale 2,18 μM) servant d'indicateur d'oxydoréduction. L'agent titrant est une solution de L-lactate de sodium 2,23 mM à pH 7,3 ajoutée avec une microseringue de type Agla.

La solution à titrer et la solution de L-lactate sont désoxygénées par barbotage d'azote « R » purifié de toutes traces d'oxygène.

On lit, après chaque addition de L-lactate, les variations d'extinction à 665, 557 et 480 mμ au spectrophotomètre Beckman DU muni d'un compartiment thermostaté à $5,5^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$. Le pH de la solution est mesuré en fin de titrage avec une électrode à hydrogène équilibrée à $5,5^{\circ}$; dans cette expérience la valeur du pH est 7,44. Les variations d'extinction à 665 et 557 mμ représentent respectivement les variations du degré d'oxydation du Bleu Méthylène et du Cytochrome (les variations d'extinction dues au cytochrome à 665 mμ et celles dues au Bleu de Méthylène à 557 mμ sont négligeables). Connaissant la courbe de variation du degré d'oxydation du cytochrome (à 557 mμ) et l'extinction molaire propre à ce groupe à 480 mμ (Tableau I), on a pu calculer la courbe de variation du degré d'oxydation de la flavine seule à 480 mμ en corrigeant la courbe globale à 480 mμ de la participation du cytochrome.

Une faible quantité de Bleu de Méthylène dont on suit la réduction à 665 mμ sert d'indicateur d'oxydoréduction (cf paragraphe suivant). Les

variations d'extinction dues à ce colorant à 557 m μ sont négligeables par rapport à celles du cytochrome de l'enzyme.

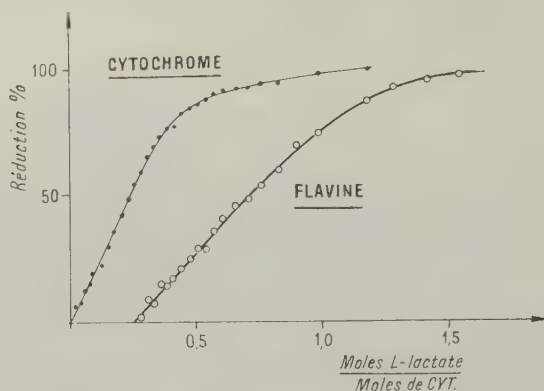


FIG. 4. — Titration d'oxydo-réduction de la L-LDH par le L-lactate : répartition des électrons entre le cytochrome et la flavine de l'enzyme.

Expérience dont les conditions ont été décrites Figure 3. Les résultats ont été calculés en pourcentages de réduction :

- pour le cytochrome d'après les variations d'extinction à 557 m μ ;
- pour la flavine d'après les variations d'extinction à 480 m μ corrigées de la participation du cytochrome à cette longueur d'onde.

Représentation graphique : pourcentages de réduction du cytochrome et de la flavine en fonction des valeurs du rapport L-lactate consommé/cytochrome total ; la quantité de cytochrome étant exprimée en m μ moles d'hème.

3°) Mesure du potentiel d'oxydoréduction des deux groupes prosthétiques :

Au cours des titrages de la L-LDH oxydée par le L-lactate, l'équilibre de répartition des électrons entre le constituant cytochromique et la flavine s'établit très rapidement, même en absence de Bleu de Méthylène. En effet, l'extinction aux différentes longueurs d'onde ne varie plus dans le temps après la première lecture soit environ une minute après l'addition du lactate.

Les potentiels de demi-réduction des deux groupes prosthétiques peuvent donc être mesurés par rapport au potentiel de demi-réduction du Bleu de Méthylène. Lorsque l'équilibre est établi, nous avons la relation classique :

$$E = E_m (BM) + \frac{RT}{2F} \ln (ox/red)_{BM} = E_m (i) + \frac{RT}{nF} \ln (ox/red)_i$$

où le premier système représente le Bleu de Méthylène (BM) et le second le système inconnu (i) qui est soit le cytochrome, soit la flavine ; n étant le nombre d'électrons liés à l'oxydoréduction du système inconnu (i).

La relation précédente, qui peut encore s'écrire sous la forme :

$$\log (\text{ox/red})_i = \frac{nF}{2,3 RT} \left[E_m (\text{BM}) - E_m (i) \right] + \frac{n}{2} \log (\text{ox/red})_{\text{BM}}$$

montre que :

a) la représentation graphique des variations de $\log (\text{ox/red})_i$ en fonction de $\log (\text{ox/red})_{\text{BM}}$ doit être une droite de pente $\frac{n}{2}$.

b) l'intersection de cette droite avec l'axe des ordonnées (lorsque $\log (\text{ox/red})_{\text{BM}} = 0$) permet de calculer la valeur du terme $[E_m (\text{BM}) - E_m (i)]$ c'est-à-dire l'écart entre les valeurs des potentiels de demi-réduction du Bleu de Méthylène et du système inconnu.

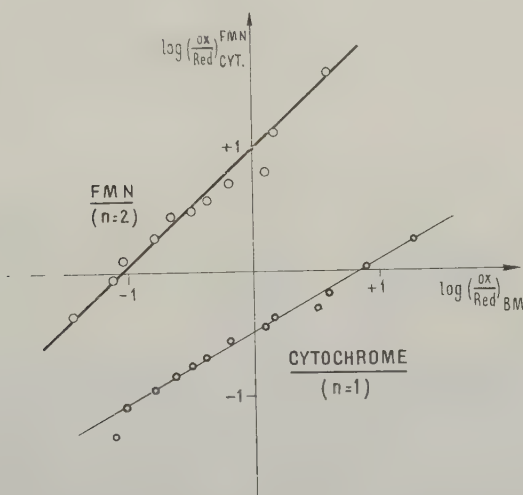


FIG. 5. — Détermination du potentiel d'oxydo-réduction des groupes prosthétiques de la L-LDH.

Expérience dont les conditions ont été décrites Figure 3. Au cours du titrage de la L-LDH oxydée par le L-lactate, on a calculé les pourcentages de réduction du cytochrome, de la flavine et du Bleu de Méthylène (servant d'indicateur d'oxydo-réduction) d'après les variations respectives des extinctions à 557, 480 et 665 m μ .

Représentation graphique : ordonnées : valeurs de $\log (\text{ox/red})$ relatives soit au cytochrome, soit à la flavine ; abscisses : valeurs de $\log (\text{ox/red})$ relatives au Bleu de Méthylène.

Pour cette expérience faite à 5,5° et pH 7,44, le terme $2,3 \frac{RT}{F}$ de l'équation introduite dans le texte a pour valeur 55,3 mV.

Les résultats d'une expérience typique ont été exploités dans cette représentation graphique (Figure 5) ; les valeurs de $\log (\text{ox/red})_i$ sont déduites des mesures spectrophotométriques comme il est indiqué précédemment. Les valeurs suivantes ont été obtenues pour les potentiels

de demi-réduction et le nombre d'électrons mis en jeu dans l'oxydo-réduction de chacun des deux groupes prosthétiques :

$$E_m(\text{Cyt.}) = E_m(\text{BM}) + 24,3 \text{ mV} \quad n = 1$$

$$E_m(\text{FMN}) = E_m(\text{BM}) - 27,7 \text{ mV} \quad n = 2$$

La valeur du potentiel de demi-réduction du Bleu de Méthylène calculée pour les conditions de cette expérience étant de + 9,7 mV, on peut estimer que les valeurs des potentiels de demi-réduction des deux groupes prosthétiques portés par la L-LDH sont, dans ces mêmes conditions :

$$E_m(\text{Cyt.}) = + 34 \text{ mV} \quad \text{et} \quad E_m(\text{FMN}) = - 18 \text{ mV}$$

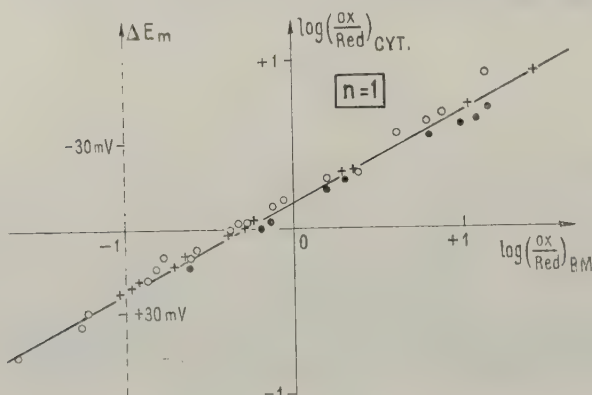


FIG. 6. — Détermination du potentiel d'oxydo-réduction du cytochrome de la L-LDH, de l'Apo—L-LDH et de la L-LDH reconstituée (Apo—L-LDH + FMN).

Des vases spectrophotométriques de type Thunberg (trajet optique 1 cm) fermés par des bouchons rodés formant réservoir, contiennent 2,5 ml d'un mélange de L-LDH, d'Apo—L-LDH ou de L-LDH reconstituée (Apo—L-LDH + FMN 1:1) et de Bleu de Méthylène, en solution dans le tampon phosphate 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 7,0. Après avoir fait le vide, on réduit ce mélange par une quantité sensiblement stœchiométrique de L-lactate contenue dans le bouchon. Le mélange est alors progressivement réoxydé par l'oxygène par admissions ménagées d'air dans le Thunberg. Après chaque entrée d'air, on mesure les extinctions à deux longueurs d'onde caractéristiques, ce qui permet de calculer le degré de réduction du cytochrome et du colorant.

a) L-LDH (—+—+—) : cytochrome 15,9 mμ moles d'hème, BM 52 mμ moles, L-lactate 120 mμ équivalents. Lecture des extinctions à 424 mμ (bande γ du cytochrome réduit) et 600 mμ (BM) ; les variations d'extinction dues au cytochrome à 600 mμ et au BM à 424 mμ sont négligeables.

b) Apo—L-LDH (—o—o—) et L-LDH reconstituée (Apo—L-LDH + FMN 1:1) (—●—●—) : cytochrome 72 mμ moles d'hème, BM 52 mμ moles, L-lactate 200 mμ équivalents. Lecture des extinctions à 557 mμ (bande α du cytochrome réduit) et à 650 mμ (BM). Les variations d'extinction dues au cytochrome à 650 mμ sont négligeables ; celles dues au BM à 557 mμ ont été corrigées en utilisant le facteur $E_{650}/E_{557} = 5,75$ pour le BM oxydé.

Pour les trois expériences, la température est $30^\circ \pm 0,2^\circ$. Les valeurs du pH des solutions en fin d'expérience ne montrent pas d'écarts supérieurs à 0,05 unités de pH par rapport au tampon initial pH 7,00.

4°) *Potentiel d'oxydoréduction du constituant cytochromique porté par la L-LDH, l'Apo—L-LDH et la L-LDH reconstituée :*

Cette étude a été entreprise afin de voir si la valeur du potentiel d'oxydoréduction du cytochrome de la L-LDH est influencée par la présence du groupe flavinique de l'enzyme.

Dans ces expériences, la valeur du potentiel d'oxydoréduction de ce groupe est déterminée spectrophotométriquement par l'étude de son équilibre avec le Bleu de Méthylène. Une solution contenant la L-LDH, l'Apo—L-LDH ou la L-LDH reconstituée (Apo—L-LDH + quantité équimoléculaire de FMN) et le Bleu de Méthylène est d'abord réduite par une quantité stoechiométrique de L-lactate, puis réoxydée progressivement par entrées d'air ménagées. Les résultats ont été exprimés dans la représentation précédemment utilisée pour les expériences de titrage de la L-LDH. Ils montrent (Figure 6) que le potentiel de demi-réduction du groupe cytochromique de l'Apo—L-LDH et de la L-LDH reconstituée est identique à celui du cytochrome de la L-LDH non traitée servant de témoin. Ce potentiel est : $E_{m7} = 0 \pm 3 \text{ mV}$ (à 30°).

DISCUSSION.

L'étude du spectre différentiel obtenu par comparaison de l'enzyme flavohémoprotéique avec l'apoenzyme hémoprotéique résultant de la dissociation du FMN a apporté quelques informations importantes concernant d'une part le spectre de la flavine oxydée fixée et d'autre part, l'état d'oxydation du groupe flavinique en présence de lactate.

Le spectre d'absorption du constituant cytochromique de l'Apo—L-LDH étant identique à celui de l'holoenzyme ainsi que nous l'avons montré précédemment [4], l'utilisation du couple L-LDH/Apo—L-LDH en spectrophotométrie différentielle nous a permis :

a) *de mettre en évidence le spectre du FMN oxydé fixé sur la L-LDH,*

b) *de démontrer qu'il y a bien réduction de la flavine de l'enzyme par le lactate.*

Le spectre flavinique ainsi mis en évidence est quelque peu différent de celui du FMN libre ; les maxima sont situés à 375 et 455 m μ , et en outre, l'extinction molaire au maximum 455 m μ est peut-être légèrement inférieure à celle du FMN libre à 445 m μ soit respectivement 11,5 et 12,5 mM⁻¹ cm⁻¹. Ce phénomène n'est pas inhabituel ; en effet, l'association des flavines à des protéines dans les flavoenzymes est souvent accompagnée d'un déplacement de leurs pics d'absorption, ce déplacement pouvant être soit vers les grandes longueurs d'onde, soit en sens inverse [20]. Ainsi pour l'ancien ferment jaune (NADPH₂ diaphorase) dont le groupe prosthétique est également FMN, le pic du spectre flavinique est situé à 465 m μ avec une extinction molaire de 10,4 mM⁻¹ cm⁻¹ [21]. Ces modifications spectrales traduisent une perturbation de

la répartition des densités électroniques dans le noyau isoalloxazine lors de l'établissement de la liaison entre la flavine et la protéine.

Dans le cas de la L-LDH, il est remarquable de constater à cet égard que la flavoprotéine dérivée de la L-LDH par détachement de l'hème présente, ainsi que MORTON et SHEPLEY l'ont montré [22, 23], un spectre de flavine libre (maxima situés à 385 et 445 m μ). Or dans ce cas, il est clair que l'intégrité des liaisons du groupe flavinique à la protéine n'a pas été respectée. En effet, ce dérivé, inactif enzymatiquement et non réactivable par le protohème, est fluorescent contrairement à la L-LDH native ou reconstituée (Apo—L-LDH + FMN) [24] et se dissocie très facilement ; d'autre part, le FMN n'est plus réductible par le lactate.

Le spectre flavinique que nous donnons ici est également différent de celui qui avait été présenté par HASEGAWA et OGURA [10]. Ces auteurs ont voulu déterminer le spectre du FMN fixé sur la L-LDH en traçant un spectre différentiel de deux solutions de L-LDH dont l'une possède le cytochrome à l'état réduit et la flavine oxydée et l'autre ces deux groupes à l'état réduit. Pour obtenir la première, ils ont réduit la L-LDH par un léger excès de lactate puis ajouté du Bleu de Méthylène jusqu'à trace de coloration bleue. Ils ont trouvé ainsi un spectre différentiel présentant, comme la flavine libre, deux bandes d'absorption situées à 385 et 445 m μ . L'échantillon de L-LDH utilisé dans cette expérience avait été préparé selon la méthode de BACH et al. [7] ; son degré de pureté est inférieur à 30 p. 100, en outre, il est particulièrement instable.

Le spectre flavinique que nous avons décrit présente par rapport à la flavine libre un déplacement des bandes en longueur d'onde qui résulte de la fixation spécifique du FMN sur la protéine. Lorsque la liaison flavine-protéine est modifiée, comme dans la flavoprotéine de MORTON et SHEPLEY, on retrouve le spectre du FMN libre. Par conséquent, dans le cas de l'expérience de HASEGAWA et OGURA, on peut penser que la liaison du FMN à la protéine n'était pas intacte, une modification pouvant être intervenue soit pendant la préparation de l'enzyme, soit au cours de l'expérience elle-même.

L'étude de la répartition des électrons provenant du L-lactate entre les deux groupes prosthétiques de la L-LDH avait fait l'objet de quelques tentatives qui n'avaient pu aboutir à des résultats décisifs. Ces travaux portaient uniquement sur la réduction du constituant cytochromique, mesurée spectrophotométriquement, au cours de titrages de l'enzyme oxydé par le lactate.

D'une part, BOERI et CUTOLO [8] ont estimé que deux électrons étaient nécessaires à la réduction d'une molécule d'enzyme portant un hème et une flavine ; ils ont proposé en conséquence un schéma selon lequel la flavine oscillerait entre un état demi-réduit (type semi-quinone) et l'état de réduction totale. Ces expériences ont été faites avec des échantillons d'enzyme très purs mais non cristallisés. D'autre part,

CHANCE et al. [9] ont suivi la réduction du cytochrome b_2 (L-LDH) cristallisé. Ces auteurs ont estimé que la stoechiométrie de cette réduction était de 1 électron-équivalent par mole d'hème du cytochrome réduit ; en fait, la valeur de la pente de la partie initiale, linéaire, de leur titrage soit $\Delta E_{557} \text{ m}\mu / \Delta (\text{lactate}) = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ est trop faible puisque l'extinction différentielle du cytochrome $\epsilon_{\text{red.}} - \epsilon_{\text{ox.}}$ est : $27,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour nos échantillons. Ceci signifie qu'en fait dans cette expérience 1 électron-équivalent provenant du L-lactate ne réduisait que 0,77 moles d'hème du cytochrome ; il est probable que ce déficit est dû à la présence de traces d'oxygène dans la solution titrée.

Dans notre travail nous pensons avoir rempli les conditions nécessaires au maintien de l'intégrité de l'enzyme, les expériences étant faites à basse température, en absence de toute trace d'oxygène et avec des échantillons de L-LDH fraîchement recristallisés. Nos résultats montrent sans ambiguïté que, dans ces conditions, *les deux groupes prosthétiques de la L-LDH se comportent comme deux systèmes d'oxydoréduction simples en équilibre : l'hème du cytochrome recevant un électron et la flavine deux électrons au cours du titrage par le L-lactate selon le schéma suivant :*



Nous n'avons donc pu déceler, à l'état stationnaire, et quel que soit le degré de réduction des deux groupes prosthétiques, d'autres formes que le cytochrome et le FMN totalement oxydés ou totalement réduits. Ce résultat n'exclut évidemment pas la possibilité d'existence d'une forme semi-quinonique de la flavine qui ne serait que transitoire, ayant une durée de vie très brève, ou bien qui existerait à l'équilibre mais en proportion trop faible pour être détectée par la technique spectrophotométrique.

Deux tentatives d'estimation du potentiel d'oxydoréduction du groupe cytochromique de la L-LDH non cristallisée sont à rappeler. HASEGAWA et OGURA [10] ont obtenu une valeur de + 120 mV (pH 6 à 8 et 25°) par l'étude spectrophotométrique de l'équilibre entre le Bleu de Toluyène et une préparation de L-LDH partiellement purifiée qui est justiciable des critiques exposées ci-dessus. BOERI et CUTOLO [11] ont trouvé pour le cytochrome un potentiel de + 220 mV (pH 5,4 à 7,6 et 20°) par titrage électrométrique d'un échantillon d'enzyme de pureté voisine de 25 p. 100 ; celui-ci contient probablement du cytochrome c : en effet, le rapport des extinctions à 557 et 550 m μ pour la solution réduite était 1,65 au lieu de 1,97 pour notre enzyme recristallisé. D'autre part, dans ce travail, aucune précision n'est donnée sur la façon dont s'établit l'équilibre entre les électrodes et la solution qui ne contient pas de colorant servant de médiateur.

Les valeurs des potentiels de demi-réduction du cytochrome et de la flavine fixés sur la L-LDH que nous avons déterminées sont respectivement (à 5,5° et pH 7,44) : + 34 mV et — 18 mV. Nous devons com-

pléter ce travail par l'étude de leurs variations en fonction de la température et du pH afin de pouvoir établir des comparaisons utiles avec les valeurs déjà connues. Il est dès à présent très intéressant de noter que *ces deux groupes prosthétiques ont des potentiels de demi-réduction relativement peu éloignés l'un de l'autre* ; celui du cytochrome étant sensiblement plus bas, et celui du FMN remarquablement plus élevé que les potentiels respectifs de la plupart des hémoprotéines et flavoprotéines actuellement connues. En particulier, la valeur élevée du potentiel de demi-réduction de la flavine de la L-LDH par rapport à celle du système lactate/pyruvate ($E_{m7} = -190$ mV [25, 26]), pourrait rendre compte du fait que cet enzyme ne catalyse pratiquement la réaction avec une vitesse notable que dans le sens de la déhydrogénation du L-lactate ; la réaction inverse, en présence de donneurs très réducteurs, n'a encore jamais été mise en évidence avec certitude [27]. Il est remarquable, à cet égard, de constater que la D-LDH, présente dans la levure cultivée en anaérobiose [28, 29], qui catalyse aisément la réaction dans les deux sens [25] possède un groupe prosthétique flavinique (le FAD) dont le potentiel de demi-réduction est très voisin de celui du système lactate/pyruvate [30].

L'existence d'une interaction entre les deux groupes prosthétiques de la L-LDH a été envisagée par MORTON et ses collaborateurs à diverses reprises [31, 32, 33] mais aucune preuve décisive n'a pu être apportée en sa faveur. Les propriétés particulières, de ce type hémochromogène, du spectre cytochromique de cet enzyme ne peuvent être expliquées au moyen de cette hypothèse [34] puisqu'elles ne sont pas modifiées par la dissociation du groupe flavinique [4, 23]. En outre, nous avons pu montrer dans ce travail que *la présence du FMN n'exerce aucune influence sur la valeur du potentiel de demi-réduction du cytochrome* qui est $E_{m7} = 0 \pm 3$ mV (à 30°) aussi bien pour la L-LDH que pour l'Apo—L-LDH et la L-LDH reconstituée. Par contre, des modifications importantes de la chaîne protéique affectent la valeur de ce potentiel ; le noyau hémoprotéique de la L-LDH résistant à l'hydrolyse trypsique (poids moléculaire environ 12.000) présente un potentiel de demi-réduction $E_{m7} = -30$ mV ainsi que l'ont montré LABEYRIE et al. (in [35]).

Nos travaux antérieurs ont démontré que le groupe prosthétique flavinique de la L-LDH est essentiel au transfert des électrons provenant du L-lactate aussi bien au constituant cytochromique de l'enzyme qu'aux accepteurs d'électrons dans la réaction catalysée [4]. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence un phénomène d'interaction coopérative entre le groupe flavinique et le site récepteur du substrat [36]. Ces observations tendent à montrer que lors de la déhydrogénation du L-lactate, les électrons sont délivrés d'abord au groupe flavinique.

Si le rôle du FMN dans le mécanisme de fonctionnement de la L-LDH se trouve ainsi largement élucidé, par contre, celui du constituant cyto-

chromique reste obscur. L'étude, par les techniques des réactions rapides, des cinétiques de réduction par le lactate des deux groupes prosthétiques a été entreprise dans deux laboratoires et devrait apporter des résultats importants sur le mode de transfert des électrons entre la flavine et le cytochrome et sur le rôle éventuel de ce dernier dans l'action catalytique. Les premiers résultats qui ont été obtenus par MORTON et STURTEVANT [33] et par IWATSUBO et DI FRANCO [37] suggèrent, ainsi que nous l'avons discuté précédemment [4], que le constituant cytochromique ne participe que pour une part minime au transfert des électrons provenant du lactate aux accepteurs dans la réaction catalysée in vitro par la L-LDH.

DISCUSSION GÉNÉRALE.

A la fin de chacune des trois parties expérimentales que comporte cet ouvrage, nous avons présenté une discussion des résultats qui y ont été décrits. Dans cette discussion générale, ces résultats seront intégrés dans un ensemble plus vaste de connaissances relatives à d'autres enzymes que la L-lacticodéshydrogénase de levure. Les principaux problèmes qui seront abordés concernent les propriétés de la liaison flavoprotéique dans la L-LDH, les interactions entre le site récepteur du substrat et le FMN prosthétique et entre les groupes prosthétiques eux-mêmes et, pour terminer, nous discuterons le rôle de la flavine et du constituant cytochromique dans la réaction catalysée par la L-LDH.

Pendant de nombreuses années, la L-LDH de la levure fût considérée comme un enzyme particulièrement labile dont l'inactivation paraissait liée à une dissociation *irréversible* de son groupe prosthétique flavinique. Malgré cette situation peu favorable, il nous a été possible de préparer un apoenzyme très peu dénaturé et hautement réactivable, après détachement du FMN par le sulfate d'ammonium acide. Ce succès a pu être obtenu en appliquant à la L-LDH cristallisée, sur les conseils de M. IWATSUBO, une variante de la technique classique de WARBURG et CHRISTIAN, dans des conditions très strictes du point de vue de la rapidité d'exécution et du maintien d'une température basse (-10 à -15°).

Compte tenu de la grande énergie de la liaison flavoprotéique dans la L-LDH (selon IWATSUBO et DI FRANCO, $K = 10^{-10}$ M pour l'enzyme cristallisé frais [1], ce résultat est assez remarquable ; on sait en effet que beaucoup de flavoenzymes fortement combinés ne peuvent être dissociés pour donner un apoenzyme réactivable.

Le traitement au sulfate d'ammonium acide, tel que nous l'avons appliqué, entraîne toutefois une modification de la structure protéique qui n'est pas réversible par recombinaison de l'Apo-L-LDH avec le FMN. Les indices de cette modification sont apparus lorsque nous avons comparé un certain nombre de propriétés physicochimiques et enzymatiques des L-LDH non traitée et reconstituée (Apo-L-LDH plus FMN saturant). C'est ainsi que les données de l'ultracentrifugation analytique (diminution de la valeur de $S_{20,w}^0$ et de la pente de la droite représentant les variations de S_{20} avec la concentration protéique) suggèrent que la forme des molécules de la L-LDH reconstituée ou de l'Apo-L-LDH est sensiblement différente de celle de l'en-

zyme témoin non traité. D'autre part, en ce qui concerne les propriétés cinétiques, les valeurs de la constante de Michaelis K_m (L-lactate) et des constantes d'inhibition K_i (D-lactate et oxalate) pour la L-LDH reconstituée sont supérieures à celles de ces mêmes constantes pour la L-LDH non traitée. Ces dernières observations reflètent probablement une diminution générale de l'affinité du substrat pour le site récepteur à la surface de l'enzyme. La différence la plus spectaculaire concerne l'énergie de la liaison flavoprotéique qui est considérablement diminuée dans la L-LDH reconstituée. Les valeurs respectives de la constante de dissociation de la flavine pour les L-LDH native et reconstituée étant $K = 1.10^{-10}$ M et 1.10^{-7} M, on peut estimer cette diminution de l'énergie de liaison à environ 4.000 calories par mole.

Toutefois, l'enzyme reconstitué possède toutes les caractéristiques essentielles de la L-LDH native. La stéréospécificité vis-à-vis du L-lactate (substrat) et du D-lactate (inhibiteur compétitif) est inchangée. L'activité molaire aussi bien que l'énergie d'activation expérimentale, dans la réaction de réduction du ferri cyanure par le L-lactate à concentration saturante, sont pratiquement identiques pour les deux formes de la L-LDH, l'étape limitante de la réaction catalytique globale apparaît donc identique dans les deux cas.

Malgré le fait que l'enzyme reconstitué n'est pas en tous points identique à la L-LDH non traitée, on peut affirmer que les informations fournies par l'étude des propriétés du système Apo-L-LDH/FMN pourront valablement être étendues à la L-LDH native.

La liaison flavoprotéique dans la L-LDH :

Comme on l'observe généralement, la combinaison du FMN avec la protéine de la L-LDH s'accompagne de modifications profondes des propriétés de cette flavine.

En ce qui concerne le spectre d'absorption lumineuse de la flavine oxydée liée à l'enzyme, nous avons pu montrer par spectrophotométrie différentielle (L-LDH contre Apo-L-LDH) qu'il présente un déplacement de la bande 445 m μ de 10 m μ vers les grandes longueurs d'onde ($\lambda_{max} = 455$ m μ) ainsi qu'une légère diminution de l'extinction molaire (environ 10 pour cent). Ces modifications spectrales résultent de la perturbation de la répartition des densités électroniques dans le noyau isoalloxazine apportée par la liaison avec la protéine. Signalons que, pour certains flavoenzymes, il a été observé, au contraire, un déplacement du maximum d'absorption vers les longueurs d'onde plus courtes [2].

Un deuxième aspect de l'interaction énergétique de la flavine avec les radiations lumineuses concerne sa fluorescence. Dès leurs premiers travaux [3], APPLEBY et MORTON ont indiqué que la fluorescence du FMN oxydé fixé sur la L-LDH semblait totalement éteinte. Récem-

ment, IWATSUBO et DI FRANCO ont étudié les propriétés du groupe prosthétique flavinique de la L-LDH par une technique fluorimétrique très sensible [1]. Ces auteurs ont pu confirmer que l'extinction de fluorescence du FMN fixé est bien totale, aussi bien pour la L-LDH native que pour le complexe reconstitué Apo-L-LDH-FMN. Cette propriété, commune à beaucoup de flavoenzymes, est généralement interprétée comme le résultat d'une liaison ou interaction de l'azote du groupe —NH (3) du noyau isoalloxazine avec un groupe de la protéine qui selon WEBER [4] pourrait être un résidu de tyrosine.

L'interaction flavine-protéine dans la L-LDH se traduit enfin par une modification importante du potentiel d'oxydo-réduction de ce groupe prosthétique par rapport à celui du FMN libre. Ce phénomène est bien connu et donne une indication très précise sur les affinités relatives des formes oxydée et réduite de la flavine pour la protéine. En effet, il existe une relation simple entre les valeurs des constantes de dissociation des formes oxydée (K_{OX}) et réduite (K_{R}) du FMN fixé et les potentiels de demi-réduction du FMN libre et combiné à la protéine [5] :

$$E_{\text{m}}(\text{FMN-Enzyme}) = E_{\text{m}}(\text{FMN libre}) + \frac{RT}{nF} \ln (K_{\text{OX}}/K_{\text{R}})$$

L'écart des valeurs des potentiels de demi-réduction est, comme on le voit, proportionnel à la valeur du rapport $K_{\text{OX}}/K_{\text{R}}$; cette relation est très importante parce que, le plus souvent, seule la valeur de la constante K_{OX} peut être déterminée expérimentalement ; la connaissance de la valeur de $E_{\text{m}}(\text{FMN-Enzyme})$ permet alors de calculer la valeur de K_{R} [6, 7]. C'est le cas pour la L-LDH puisque seule la valeur de K_{OX} ($\approx 1.10 \cdot 10^{-10}\text{M}$) a pu être mesurée par IWATSUBO et DI FRANCO. Le calcul de la valeur de K_{R} pour cet enzyme ne peut pas être fait actuellement parce que nous ne disposons que d'une valeur de $E_{\text{m}}(\text{FMN-Enzyme})$ mesurée à une basse température ($5,5^{\circ}$) pour laquelle le potentiel de demi-réduction du FMN libre n'a pas été déterminé. Quoiqu'il en soit, la valeur élevée du potentiel de demi-réduction du FMN fixé sur la L-LDH montre que la forme réduite du FMN est beaucoup plus fortement liée à la protéine que la forme oxydée. En effet, même en appliquant au potentiel $E_{\text{m}}(\text{FMN-Enzyme})$ un coefficient thermique élevé ($-\Delta E_{\text{m}}$ égal à quelques mVolts par degré), l'écart des potentiels de demi-réduction du FMN lié et libre indiquerait un rapport $K_{\text{R}}/K_{\text{OX}}$ égal à quelques puissances de dix. Il n'est pas possible non plus, et pour la même raison, d'établir une comparaison définitive entre la valeur de ce potentiel de demi-réduction et celles qui sont actuellement connues pour d'autres flavoenzymes. Il semble toutefois que le potentiel $E_{\text{m}7}$ (à 30°) doive être plus voisin de celui du FMN de la NADPH₂ Diaphorase (-123 mV [6]) que de celui du FAD de la D-LDH (-178 mV [7]).

On sait depuis les travaux remarquables du laboratoire de H. THEORELL, que l'association des groupes prosthétiques flaviniques (FMN ou FAD) avec les apoenzymes protéiques met en jeu plusieurs liaisons de caractère essentiellement électrostatique ; c'est le cas de la NADPH₂ Diaphorase [8, 9] et de la D-aminoacide oxydase [10] dans lesquels le résidu phosphoryl de la flavine participe à la liaison avec la protéine. En ce qui concerne la L-LDH, nous avons également mis en évidence ce type de liaison : l'étude cinétique de la compétition entre phosphate ou pyrophosphate et FMN pour le site de fixation de ce dernier sur la protéine permet, à partir des valeurs de la constante d'inhibition K_i , d'estimer la part de l'énergie de liaison qui revient à ce groupe. Cette liaison met en jeu très probablement une interaction entre la forme doublement ionisée du phosphate PO_4H^{-2} et un groupe aminé complémentaire de la protéine [11]. Puisque, pour le phosphate, à pH 7,3 la valeur de K_i est 14 mM (exprimée en phosphate total), la valeur de K_i relative à l'ion PO_4H^{-2} est environ 10 mM ; ce qui correspond à une variation d'énergie libre, pour la combinaison, d'environ 2.750 cal./mole ($\Delta G = -RT \ln K_i$). Il semble donc que le résidu phosphoryl n'apporte qu'une part minime de l'énergie de la liaison globale du FMN qui s'élève à 12.800 cal./mole pour la L-LDH native ($K = 1.10^{-10}\text{M}$) et à 9.000 cal./mole pour la L-LDH reconstituée ($K = 1.10^{-7}\text{M}$).

En dehors du résidu phosphoryl, il existe généralement au moins une seconde liaison par le $-\text{NH}$ (3) du noyau isoalloxazine ; l'interaction de celui-ci avec la protéine serait responsable de l'extinction de la fluorescence de la flavine ainsi que nous l'avons discuté plus haut. En ce qui concerne la L-LDH l'énergie de liaison par le noyau isoalloxazine est très faible puisque la riboflavine n'est pas compétitive avec le FMN. Ce résultat peut s'expliquer si on accorde à la liaison du phosphoryl un rôle primordial comme THEORELL et NYGAARD l'ont envisagé [12].

Les études cinétiques de la combinaison et de la dissociation du FMN dans la NADPH₂ Diaphorase (THEORELL et NYGAARD [8]) et dans la L-LDH (IWATSUBO et DI FRANCO [1]) montrent qu'il n'est pas possible de mettre en évidence l'établissement successif de plusieurs liaisons. En effet, les ordres des réactions de dissociation et d'association sont respectivement un et deux comme dans les cas simple où deux molécules se combinent par une seule liaison. Comme THEORELL et NYGAARD l'ont fait remarquer [12], l'association du FMN semble mettre en jeu un phénomène coopératif tel que, lorsque la première liaison est établie (probablement par le résidu phosphoryl), le noyau isoalloxazine pourrait se trouver orienté de telle manière, par rapport à la surface réceptrice de la protéine, que l'autre (ou les autres) liaison s'établirait instantanément. Ces considérations appellent donc quelques réserves quant à l'utilisation de la valeur de K_i pour l'ion

phosphate libre comme base de calcul de l'énergie de liaison apportée par le phosphoryl du FMN ; la constante intrinsèque de dissociation de ce dernier groupe pouvant éventuellement être différente de la valeur de ce K_1 .

Dans un travail très récent, IWATSUBO et Di FRANCO [13] ont étudié la fluorescence de la partie protéique de la L-LDH et de ses dérivés. Ils ont en particulier observé, au cours du titrage de l'Apo-L-LDH par le FMN, l'extinction partielle de la fluorescence des groupes tyrosine et tryptophane. Ces observations indiquent qu'il y a transfert de l'énergie d'excitation électronique entre ces deux acides aminés et le FMN selon un mécanisme qui reste à découvrir.

La fixation du FMN modifie de façon importante la structure de la molécule d'Apo-L-LDH. Cette modification est illustrée (1) par la grande différence de solubilité entre les enzymes natif et reconstitué d'une part, et l'apoenzyme d'autre part ; (2) par la variation d'entropie très importante (-30 à -60 calories par degré) qui accompagne l'association du FMN avec l'Apo-L-LDH en présence d'ions carboxyliques (IWATSUBO et Di FRANCO [1]), traduisant une organisation de la molécule.

En fait, l'énergie de la liaison de la flavine est très sensible à l'intégrité de la structure protéique, dans l'enzyme vieillie elle est très diminuée et devient voisine de celle observée pour l'enzyme reconstitué [1]. Un relâchement de la structure protéique doit diminuer le nombre de points d'interaction entre le FMN et la protéine et, par conséquent, diminuer l'affinité globale de l'apoenzyme pour ce groupe prosthétique.

Interaction entre le site récepteur du substrat et le FMN prosthétique :

Nous avons montré l'existence d'une interaction coopérative dans la fixation sur la L-LDH d'un inhibiteur compétitif, l'oxalate, et de la flavine prosthétique ; cette interaction se manifeste par la variation de la constante de dissociation du complexe Apo-L-LDH-FMN en présence de l'oxalate, et, réciproquement, par une variation de la constante de Michaelis pour le L-lactate avec le taux de saturation de l'apoenzyme en flavine.

Alors que l'interprétation de ce deuxième type d'expériences, purement cinétiques, est difficile parce qu'on ne peut pas identifier la constante de Michaelis à la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat, le premier peut être interprété simplement en admettant que l'énergie de la liaison flavine-protéine est plus grande en présence d'oxalate fixé. Cet accroissement de l'énergie de la liaison n'a pas pu être chiffré parce que notre technique n'est pas assez sensible pour mesurer la valeur de la constante de dissociation du complexe flavoprotéique à saturation en oxalate.

Ces toutes dernières années, un certain nombre de travaux ont montré l'existence de telles interactions dans la fixation, sur les protéines enzymatiques, des substrats ou de leurs analogues d'une part, et des coenzymes d'autre part.

En 1960, sur la L-glutamico-déshydrogénase, FISHER et Mac GREGOR [14] ont montré que le L-glutamate, substrat hydrogéné, augmentait l'affinité de l'enzyme pour le NADPH_2 , ce qui se traduit par une variation, avec la concentration de L-glutamate, de l'affinité apparente de l'enzyme pour le coenzyme. Au même moment, THEORELL et coll. [15, 16] trouvaient, pour la malate déshydrogénase et l'alcool déshydrogénase, que l'énergie des deux liaisons enzyme-coenzyme et enzyme-substrat était plus forte dans le complexe ternaire que dans les complexes binaires, ceci correspondant à une stabilisation mutuelle des liaisons. Ces résultats expliquaient toute une série d'observations antérieures qui avaient montré des accroissements de la fluorescence des coenzymes réduits fixés à différents enzymes, par addition des substrats ou de leurs analogues [17, 19].

En ce qui concerne les flavoenzymes, aucun travail, en dehors de notre expérimentation, n'a encore clairement mis en évidence un effet d'interaction coopérative dans la fixation de substrats ou analogues et du groupe prosthétique. Un travail très récent de DIXON et KLEPPE [20] montre une diminution, dans le même rapport, des vitesses d'association et de dissociation du FAD prosthétique de la D-amino-oxydase en présence d'inhibiteurs compétitifs ; il ne semble donc pas y avoir d'effet sur l'équilibre de fixation. D'autres types d'interactions ont été observées : YAGI et OZAWA [21] trouvent un inhibiteur (le p-aminobenzoate) compétitif à la fois avec le substrat et avec un analogue du groupe prosthétique. IWATSUBO et LABEYRIE ont constaté, sur la D-lactico-déshydrogénase de la levure anaérobie, une protection partielle exercée par le substrat vis-à-vis d'un inhibiteur compétitif avec la flavine [22].

Un autre aspect par lequel se traduit l'influence de la fixation du substrat sur les propriétés du groupe prosthétique a été mis en évidence en 1963-1964 : il s'agit de modifications spécifiques des propriétés spectrales du groupe flavinique en présence de substrat ou d'analogues [23, 24, 25].

Le complexe ternaire enzyme-coenzyme-substrat (ou analogue) a, comme il a été montré dans plusieurs cas, des propriétés physiques très différentes des complexes binaires ou de l'apoenzyme. Ceci montre l'influence de la fixation des effecteurs sur la partie protéique. Citons : l'augmentation de la stabilité de la D-aminoacide-oxydase vis-à-vis de l'inactivation thermique (BURTON, 1951 [26]), la diminution de solubilité dans certaines conditions qui a permis d'obtenir la cristallisation de plusieurs complexes de la D-aminoacide-oxydase avec des substrats ou inhibiteurs [27, 29].

Les phénomènes d'interaction entre le site de fixation du substrat (ou analogues) et le site récepteur des cofacteurs à la surface de la protéine présentent sans doute un caractère de généralité qui est très important pour la compréhension du mécanisme de fonctionnement de ces enzymes. Ces phénomènes s'expriment à la fois dans les propriétés énergétiques de la liaison coenzyme-protéine et dans les changements spectraux (en absorption ou fluorescence) liés à une différence dans la répartition des densités électroniques dans la partie active du cofacteur libre ou fixé. Il s'agit de deux aspects particuliers du phénomène d'activation conférant au complexe coenzyme-protéine ses propriétés enzymatiques.

La nature de ces interactions est encore très mal connue et il est possible que le phénomène global observé de stabilisation mutuelle des complexes recouvre en réalité plusieurs types de mécanismes. En tout premier lieu, on peut se demander si ces interactions s'exercent entre groupes voisins ou en des points distants de la molécule protéique par le jeu de transitions structurales de type allostérique ou autre.

Les interactions entre les groupes prosthétiques de la L-LDH :

La recherche d'interactions entre les groupes prosthétiques de la L-LDH présentait un grand intérêt puisque, selon les résultats des études hydrodynamiques, l'unité moléculaire existant en solution comporterait deux molécules de FMN et deux de protohème. Ce problème n'a jamais été perdu de vue au cours de notre travail mais, toutefois, aucun indice d'interaction n'a pu être recueilli.

En ce qui concerne le groupe flavinique, l'analyse des courbes obtenues par l'étude cinétique de la saturation de l'Apo-L-LDH par le FMN a montré que la restauration de l'activité enzymatique était liée à la fixation d'une seule molécule de FMN et que, d'autre part, l'affinité de tous les sites de combinaison était identique. Ce dernier résultat est également apparu clairement dans le travail d'IWATSUBO et DI FRANCO (méthode fluorimétrique) : les isothermes de combinaison du FMN avec l'Apo-L-LDH montrent que l'affinité des sites ne varie pas avec le taux de combinaison [1].

L'hypothèse d'une interaction entre FMN et protohème avait été envisagée à plusieurs reprises, ainsi que nous l'avons exposé précédemment, mais semble ne pas devoir être retenue. En effet, nous avons montré d'une part que le détachement du FMN ne modifie pas les propriétés spectrales du constituant cytochromique de la L-LDH, et que, d'autre part, le potentiel de demi-réduction de l'hème de ce constituant est identique pour l'Apo-L-LDH et pour le flavohémocoenzyme ($E_{m,7} = 0 \pm 3$ mV à 30°).

Le domaine des interactions hème-hème n'a pas pu être abordé directement dans ce travail. La très forte intensité des bandes du spectre d'absorption, de type hémochromogène, de l'enzyme réduit

pourrait éventuellement résulter d'un arrangement structural particulier des deux molécules de protohème dans la molécule de L-LDH. Toutefois, un noyau cytochromique b_2 , préparé par hydrolyse exhaustive de la L-LDH, qui possède un seul hème par molécule de masse 12.000 environ, présente un spectre d'absorption lumineuse pratiquement identique à celui de la L-LDH avec une légère diminution (~ 15 p. 100) des extinctions molaires [30, 31].

Le rôle du FMN et de l'hème dans la fonction catalytique :

Il était unanimement admis que le FMN prosthétique participait à la fonction catalytique de la L-LDH ; toutefois, aucune preuve expérimentale directe n'avait pu être apportée avant que l'on ait obtenu une dissociation réversible de ce groupe. Le détachement du FMN de la L-LDH cristallisée a été obtenu par le sulfate d'ammonium acide, par MORTON et par nous même indépendamment. Ce succès a par conséquent ouvert des voies d'approche plus directes pour l'étude du rôle de la flavine dans la réaction catalysée.

Nous avons pu observer que le détachement de la flavine de la L-LDH par le traitement au sulfate d'ammonium acide était accompagné d'une perte de l'activité enzymatique, que celle-ci soit mesurée par le transfert des électrons du lactate au ferricyanure ou au ferricytochrome c. Toutefois, il est apparu difficile d'obtenir, par ce moyen, un apoenzyme dépourvu de toute trace de flavine et, en fait, les solutions d'Apo-L-LDH résultant de ce seul traitement (Apo-L-LDH_{brute}) possèdent une certaine activité résiduelle. Il était par conséquent très important de montrer que l'activité de l'Apo-L-LDH elle-même était réellement nulle. L'étude de l'activité de solutions d'Apo-L-LDH contenant de très petites quantités connues et variables de FMN (de l'ordre du pour cent par rapport à l'hème) nous a permis, par extrapolation à (FMN) = 0, de démontrer qu'il en est bien ainsi. En outre, nous avons montré que l'hème du constituant cytochromique de l'Apo-L-LDH n'était plus réductible, en présence de lactate, lorsque l'apoenzyme est dépourvu de toute trace de flavine. Ce résultat est très important car il prouve que le FMN prosthétique est un intermédiaire nécessaire au transfert des électrons du lactate, non seulement aux accepteurs externes dans la réaction catalysée, mais aussi au constituant cytochromique de l'enzyme lui-même.

En étudiant les propriétés de l'Apo-L-LDH, nous avons trouvé que le départ du FMN ne modifiait pas de façon détectable le spectre cytochromique de l'hémoprotéine. Il est donc devenu possible, par spectrophotométrie différentielle (L-LDH contre Apo-L-LDH) de mettre en évidence le spectre du FMN combiné et de démontrer que ce groupe prosthétique est bien réduit lorsque le lactate est ajouté à l'enzyme. Outre l'intérêt de ce résultat du point de vue du rôle fonctionnel du FMN, la connaissance du spectre de la flavine fixée nous a permis

de mettre au point une technique spectrophotométrique pour l'étude du potentiel d'oxydo-réduction des deux groupes prosthétiques de la L-LDH.

Les résultats de l'étude de l'équilibre d'oxydo-réduction des deux groupes prosthétiques de la L-LDH ont montré que ces groupes se comportent comme deux systèmes simples et indépendants. Il est important de remarquer que si, à l'équilibre, il n'est pas apparu de formes décelables autres que le FMN et le cytochrome totalement réduits ou oxydés, ce résultat ne peut exclure la possibilité de formation transitoire d'une semiquinone du FMN lorsque la L-LDH fonctionne en présence du substrat et de l'accepteur d'électrons.

Remarquons que les valeurs respectives des potentiels de demi-réduction des groupes prosthétiques de la L-LDH (pour la flavine : $E_m = -18$ mV et pour le cytochrome : $E_m = +34$ mV à pH 7,44 et 5,5°) sont intermédiaires entre celui du système spécifiquement couplé à l'enzyme (lactate-pyruvate : $E_{m,7} = -190$ mV) et ceux des accepteurs de potentiels élevés (ferricytochrome c ou ferricyanure) intervenant dans le sens de l'oxydation du lactate. Dans le sens de la réduction du pyruvate par les donneurs de très bas potentiels ($E_{m,7} \ll -190$ mV) les potentiels des groupes de l'enzyme sont très supérieurs à celui de chacun des systèmes échangeant les électrons.

Jusqu'à présent, il était admis que le constituant cytochromique participait à la fonction catalytique de la L-LDH. En fait, aucune preuve directe n'a pu être apportée sur ce point puisque, en particulier, il n'a été possible de détacher l'hème que dans des conditions extrêmement sévères qui s'accompagnent d'une dénaturation profonde de la protéine [32]. Des travaux très récents semblent montrer au contraire que l'hème du constituant cytochromique ne joue pas un rôle essentiel dans le transfert des électrons, *in vitro*, entre lactate et accepteurs. Ces travaux, basés sur les techniques d'étude des réactions rapides, sont dus à IWATSUBO et DI FRANCO [32]. Ceux-ci ont pu mesurer simultanément les vitesses de réduction du FMN et du cytochrome de l'enzyme par le L-lactate et, dans les mêmes conditions, la vitesse de réduction des accepteurs. Il apparaît que la vitesse de réduction de l'hème est très inférieure à la vitesse de réduction du FMN prosthétique qui est elle-même du même ordre de grandeur que la vitesse de réduction du ferricytochrome c. Ces résultats ont été obtenus dans des conditions sous-optimales (bas pH, basse température et faibles concentrations de L-lactate), mais ne semblent pas dépendre de ces différents facteurs. Il paraît donc que, contrairement aux schémas réactionnels admis jusqu'à ce jour, la voie de transfert des électrons provenant du L-lactate vers les accepteurs passe essentiellement par le groupe prosthétique flavinique et accessoirement seulement par l'hème. L'ensemble des connaissances acquises grâce à notre propre

forme important de la molécule protéique consécutive au traitement en milieu acide. L'Apo-L-LDH possède une certaine activité résiduelle due au FMN contaminant ; celui-ci peut être en grande partie éliminé par chromatographie de l'hémoprotéine sur colonne de Sephadex G25. La restauration de l'activité enzymatique est obtenue par addition de FMN dans le mélange standard de mesure de l'activité, la combinaison du FMN avec l'Apo-L-LDH est alors très rapide (quelques secondes) et spécifique de cette flavine. L'activité molaire de la L-LDH ainsi reconstituée dépend de l'état de l'enzyme soumis au traitement acide ; dans les meilleurs cas, elle atteint jusqu'à 70 à 80 pour cent de l'activité molaire maximale de la L-LDH. L'enzyme reconstitué a pu être cristallisé par dialyse à faible force ionique. L'étude des propriétés enzymatiques de l'Apo-L-LDH contenant des quantités très faibles de flavine (de l'ordre du pour cent par rapport à l'hème) nous a permis de démontrer, par extrapolation, qu'en absence de toute trace de FMN, l'activité catalytique de l'apoenzyme est réellement nulle ; parallèlement son constituant cytochromique n'est plus réductible par le lactate. On prouve ainsi que le FMN est un intermédiaire essentiel pour ces deux types de transferts d'électrons.

La seconde partie a été consacrée à l'étude de l'équilibre d'association du FMN à l'hémoprotéine (Apo-L-LDH). L'analyse des courbes de saturation, suivie par la restauration de l'activité, montre qu'une seule molécule de flavine est nécessaire pour réactiver un site enzymatique et permet de déterminer la constante apparente de demi-saturation. Cette méthode cinétique et une technique de dilution du complexe Apo-L-LDH-FMN ont été utilisées pour étudier l'effet de quelques réactifs sur la combinaison du FMN. Il a été possible de montrer que le résidu phosphoryl du FMN intervient dans la fixation de ce groupe sur la protéine, que l'affinité du noyau isoalloxazine pour le site récepteur du FMN est très faible et que l'oxalate (inhibiteur compétitif) et probablement le substrat exercent un effet coopératif pour la combinaison flavine-protéine. D'autre part, nous décrivons une étude comparée des propriétés cinétiques (variation de V avec la température, de V et K_m (L-lactate) avec le pH, inhibition par le D-lactate et l'oxalate) des L-LDH non traitée et reconstituée (Apo-L-LDH + FMN saturant) ; pour les deux formes de l'enzyme, ces propriétés sont très voisines.

Dans la troisième partie, nous présentons les résultats d'une étude spectrophotométrique des propriétés d'oxydo-réduction des deux groupes prosthétiques de la L-LDH. Au cours du titrage anoxyque de la L-LDH oxydée par le L-lactate, la réduction complète des deux groupes prosthétiques est obtenue avec trois électron-équivalents pour une quantité d'enzyme contenant une mole de FMN et une mole d'hème du constituant cytochromique. La pente des courbes de titrage montre que la réduction de la flavine met en jeu deux électrons et celle de

l'hème un électron ; ces deux groupes se comportent donc comme deux systèmes indépendants en équilibre. Les valeurs des potentiels de demi-réduction, déterminées par équilibre avec le Bleu de Méthylène, sont les suivantes : pour le cytochrome : $E_m = + 34$ mV et pour le FMN : $E_m = - 18$ mV (à pH 7,44 et 5,5⁰). Le potentiel de demi-réduction du constituant cytochromique de l'Apo-L-LDH et de l'enzyme reconstitué est identique à celui de la L-LDH ($E_{m,7} = 0 \pm 3$ mV à 30°).

Enfin, dans une discussion générale, nous avons repris l'ensemble des résultats présentés dans ce travail et des conclusions qu'ils ont permis de tirer, en les intégrant aux connaissances récemment acquises tant sur la L-LDH que sur d'autres enzymes d'oxydo-réduction. Nous avons tout particulièrement mis l'accent sur les phénomènes physico-chimiques qui accompagnent la formation des complexes protéine-groupe prosthétique (ou coenzyme) puisqu'ils apparaissent comme des facteurs déterminants pour la fonction catalytique.

BIBLIOGRAPHIE.

Introduction générale.

1. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry, 1961, Pergamon Press.
2. BERNHEIM, F. — *Biochem. J.*, 1928, **22**, 1179.
3. BACH, S. J., DIXON, M. et KEILIN, D. — *Nature*, 1942, **149**, 21.
4. BACH, S. J., DIXON, M. et ZERFAS, L. G. — *Nature*, 1942, **149**, 48.
5. BACH, S. J., DIXON, M. et ZERFAS, L. G. — *Biochem. J.*, 1946, **40**, 229.
6. APPLEBY, C. A. et MORTON, R. K. — *Nature*, 1954, **173**, 749.
7. BOERI, E., CUTOLO, E., LUZZATI, M. et TOSI, L. — *Arch. Biochem. Biophys.* 1955, **56**, 487.
8. NYGAARD, A. P. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, **30**, 450.
9. APPLEBY, C. A. et MORTON, R. K. — *Biochem. J.*, 1959, **71**, 492.
10. APPLEBY, C. A. et MORTON, R. K. — *Biochem. J.*, 1959, **73**, 539.
11. ARMSTRONG, J. McD., COATES, J. H. et MORTON, R. K. — *Nature*, 1960, **186**, 1033.
12. NYGAARD, A. P. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, **33**, 517.
13. NYGAARD, A. P. — *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 1961, **94**, 774.
14. BOERI, E. et RIPPA, M. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, **94**, 336.
15. MORTON, R. K. et ARMSTRONG, J. McD. — Vth International Congress of Biochemistry, Moscow, 1961, Pergamon Press, 1963, p. 213.
16. APPLEBY, C. A. et MORTON, R. K. — *Biochem. J.*, 1960, **75**, 258.
17. MONTAGUE, M. D. et MORTON, R. K. — *Nature*, 1960, **187**, 916.
18. MAHLER, H. R. et Da SILVA PEREIRA, A. — *J. Mol. Biol.*, 1962, **5**, 325.
19. MORTON, R. K. et SHEPLEY, K. — *Nature*, 1961, **192**, 639.
20. ARMSTRONG, J. McD., COATES, J. H. et MORTON, R. K. — *Biochem. J.*, 1963, **88**, 266.
21. APPLEBY, C. A., MORTON, R. K. et SIMMONDS, D. H. — *Biochem. J.*, 1960, **75**, 72.
22. HINKSON, J. W. — Ph. D. Thesis, Indiana University, 1962.
23. ARMSTRONG, J. McD., COATES, J. H. et MORTON, R. K. — *Biochem. J.*, 1963, **86**, 136.
24. YAMANAKA, T., HORIO, T. et OKUNUKI, K. — *J. Biochem.*, 1958, **45**, 291.
25. DIKSTEIN, S. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, **36**, 397.
26. MORTON, R. K., ARMSTRONG, J. McD. et APPLEBY, C. A. — In « Hematin Enzymes » Symp. Canberra 1959, FALK, J. E., LEMBERG, R. et MORTON, R. K. Edit., Pergamon Press, p. 501.
27. NYGAARD, A. P. — *J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, 2779.
28. HASEGAWA, H. et OGURA, Y. — In « Hematin Enzymes » Symp. Canberra 1959, FALK, J. E., LEMBERG, R. et MORTON, R. K. Edit., Pergamon Press, p. 534.
29. BOERI, E. et RIPPA, M. — In « Hematin Enzymes » Symp. Canberra 1959, FALK, J. E., LEMBERG, R. et MORTON, R. K. Edit., Pergamon Press, p. 524.
30. BOERI, E. et TOSI, L. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, **60**, 463.
31. ROSSI FANELLI, A., ANTONINI, E. et CAPUTO, A. — In *Adv. in Prot. Chem.*, 1964, **19**, 73.
32. MORTON, R. K. et SHEPLEY, K. — *Biochem. Z.*, 1963, **338**, 122.
33. YAMASHITA, J., HIGASHI, T., YAMANAKA, T., NOZAKI, M., MIZUSHIMA, H., MATSUBARA, H., HORIO, T. et OKUNUKI, K. — *Nature*, 1957, **179**, 959.
34. LABEYRIE, F. et SLONIMSKI, P. P. — *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1964, **46**, 1793.
35. YAMASHITA, J., HORIO, T. et OKUNUKI, K. — *J. Biochem.*, 1958, **45**, 707.
36. NYGAARD, A. P. — *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 742.
37. HINKSON, J. W. et MAHLER, H. R. — *Biochemistry*, 1963, **2**, 209.

38. BOERI, E. et CUTOLO, E. — In « Hematin Enzymes » Symp. Canberra 1959, FALK, J. E., LEMBERG, R. et MORTON, R. K. Edit., Pergamon Press, p. 568.
39. IWATSUBO, M. et CURDEL, A. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1962, **6**, 385.
40. MORTON, R. K. — *Nature*, 1961, **192**, 727.

Première partie.

1. APPLEBY, C. A. et MORTON, R. K. — *Nature*, 1954, **173**, 749.
2. BOERI, E., CUTOLO, E., LUZZATI, M. et TOSI, L. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1955, **56**, 487.
3. MORTON, R. K., ARMSTRONG, J. McD. et APPLEBY, C. A. — In « Hematin Enzymes » Symp. Canberra 1959, FALK, J. E., LEMBERG, R. et MORTON, R. K. Edit. Pergamon Press, p. 501.
4. HINKSON, J. W. et MAHLER, H. R. — *Biochemistry*, 1963, **2**, 209.
5. APPLEBY, C. A. et MORTON, R. K. — *Biochem. J.*, 1959, **73**, 539.
6. NYGAARD, A. P. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1958 **30**, 450.
7. NYGAARD, A. P. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, **35**, 212.
8. ARMSTRONG, J. McD., COATES, J. H. et MORTON, R. K. — *Nature*, 1960, **186**, 1033.
9. MORTON, R. K. — *Nature*, 1961, **192**, 727.
10. BAUDRAS, A. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1962, **7**, 310.
11. WARBURG, O. et CHRISTIAN, W. — *Biochem. Z.*, 1938, **298**, 150.
12. APPLEBY, C. A. et MORTON, R. K. — *Biochem. J.*, 1959, **71**, 492.
13. ARMSTRONG, J. McD., COATES, J. H. et MORTON, R. K. — *Biochem. J.*, 1963, **86**, 136.
14. HINKSON, J. W. — Ph. D. Thesis, Indiana University, 1962.
15. RIPPA, M. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, **94**, 333.
16. LABEYRIE, F. et SLONIMSKI, P. P. — *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1964, **46**, 1793.
17. MORTON, R. K. et SHEPLEY, K. — *Biochem. Z.*, 1963, **338**, 122.
18. LABEYRIE, F., SLONIMSKI, P. P. et NASLIN, L. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, **34**, 262.
19. WHITBY, L. G. — *Biochem. J.*, 1953, **54**, 437.
20. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. et RANDALL, R. J. — *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265.
21. FOLIN, O. et CIOCALTEU, V. — *J. Biol. Chem.*, 1927, **73**, 627.
22. POLIS, B. D., SCHMUKLER, H. W., CUSTER, J. H. et Mc MEEKIN, T. L. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 4965.
23. BOERI, E. et TOSI, L. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, **60**, 463.
24. SLONIMSKI, P. P. et TYSAROWSKI, W. — *C. R. Acad. Sc.*, 1958, **246**, 1111.
25. APPLEBY, C. A. et MORTON, R. K. — *Biochem. J.*, 1960, **75**, 258.
26. MONTAGUE, M. D. et MORTON, R. K. — *Nature*, 1960, **187**, 916.
27. KILGOUR, G. L., FELTON, S. P. et HUENNEKENS, F. M. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 2254.
28. IWATSUBO, M. et DI FRANCO, A. — *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1965, **47**, 891.
29. ARMSTRONG, J. McD., COATES, J. H. et MORTON, R. K. — *Biochem. J.*, 1963, **88**, 266.
30. BOERI, E. et RIPPA, M. — In « Hematin Enzymes » Symp. Canberra 1959, FALK, J. E., LEMBERG, R. et MORTON, R. K. Edit., Pergamon Press, p. 524.
31. MORTON, R. K. et SHEPLEY, K. — *Nature*, 1961, **192**, 639.
32. BAUDRAS, A. — *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1965, **47**, 1449.
33. BAUDRAS, A. — *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1965, **47**, 1177.
34. MORTON, R. K. et STURTEVANT, J. M. — *J. Biol. Chem.*, 1964, **239**, 1614.
35. IWATSUBO, M. et DI FRANCO, A. — Article en préparation.
36. VAN GELDER, B. F. et SLATER, E. C. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, **58**, 593.

Deuxième partie.

1. BAUDRAS, A. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1962, **7**, 310.
2. BAUDRAS, A. — *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1965, **47**, 1143.
3. IWATSUBO, M. et DI FRANCO, A. — *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1965, **47**, 891.

4. THEORELL, H. et NYGAARD, A. P. — *Acta Chem. Scand.*, 1954, 8, 1649.
5. APPLEBY, C. A. et MORTON, R. K. — *Biochem. J.*, 1959, 73, 539.
6. DIKSTEIN, S. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, 3, 397.
7. NYGAARD, A. P. — *J. Biol. Chem.*, 1961, 236, 2779.
8. HINKSON, J. W. et MAHLER, H. R. — *Biochemistry*, 1963, 2, 216.
9. SOMLO, M. — Résultats non publiés.
10. BERGMAN, F. et SEGAL, R. — *Biochem. J.*, 1954, 58, 692.
11. BERNHEIM, F. — *Biochem. J.*, 1928, 22, 1179.
12. THEORELL, H. et NYGAARD, A. P. — *Archiv. för Chemi*, 1954, 7, 205.
13. WALAAS, O. et WALAAS, E. — *Acta Chem. Scand.*, 1956, 10, 122.
14. THEORELL, H. et NYGAARD, A. P. — *Acta Chem. Scand.*, 1954, 8, 877.
15. BURTON, K. — *Biochem. J.*, 1951, 48, 458.
16. LABEYRIE, F. et STACHIEWICZ, E. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 52, 136.
17. IWATSUBO, M. et LABEYRIE, F. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 59, 614.
18. WURMSER, R. — *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1958, 40, 2091.
19. SOMLO, M. et SLONIMSKI, P. P. — Article en préparation.
20. CLERTANT, P. — D. E. S. Faculté des Sciences, Paris, 1963.

Troisième partie.

1. APPLEBY, C. A. et MORTON, R. K. — *Nature*, 1954, 173, 749.
2. BOERI, E., CUTOLO, E., LUZZATI, M. et TOSI, L. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1955, 56, 487.
3. ARMSTRONG, J. McD., COATES, J. H. et MORTON, R. K. — *Biochem J.*, 1963, 86, 136.
4. BAUDRAS, A. — *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1965, 47, 1143.
5. BAUDRAS, A. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1962, 7, 310.
6. BACH, S. J., DIXON, M. et KEILIN, D. — *Nature*, 1942, 149, 21.
7. BACH, S. J., DIXON, M. et ZERFAS, L. G. — *Biochem. J.*, 1946, 40, 229.
8. « The Problem of Cytochrome b_2 », Discussion, in « Haematin Enzymes », Symp. Canberra, 1959, Falk, J. E., Lemberg, R. et Morton, R. K., Edit., Pergamon Press, p. 568.
9. CHANGE, B., KLINGENBERG, M. et BOERI, E. — *Fed. Proc.*, 1956, 15, 231.
10. HASEGAWA, H. et OGURA, Y. — In « Haematin Enzymes », Symp., Canberra, 1959, Falk, J. E., Lemberg, R. et Morton, R. K., Edit., Pergamon Press, p. 534.
11. BOERI, E. et CUTOLO, E. — *Bull. Soc. Ital. Biol. Speriment.*, 1957, 33, 1.
12. APPLEBY, C. A. et MORTON, R. K. — *Biochem. J.*, 1959, 73, 539.
13. LABEYRIE, F., SLONIMSKI, P. P. et NASLIN, L. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, 34, 262.
14. CLARK, W. M., COHEN, B. et GIBBS, H. D. — *Public Health Rep. (U. S.)*, 1925, 40, 1131.
15. BATES, R. G. — *Electrometric pH Determinations*, John Wiley and Sons Inc., 1954, p. 74.
16. MONTAGUE, M. D. et MORTON, R. K. — *Nature*, 1960, 187, 916.
17. ARMSTRONG, J. McD., COATES, J. H. et MORTON, R. K. — *Biochem. J.*, 1963, 88, 266.
18. MAHLER, H. R. et DA SILVA PEREIRA, A. — *J. Mol. Biol.*, 1962, 5, 325.
19. WITHEY, L. G. — *Biochem. J.*, 1953, 54, 437.
20. BEINERT, H. — In « the Enzymes », Boyer, P. D., Lardy, H. et Myrback, K., Edit., Acad. Press, New York, 1960, vol. 2, p. 339.
21. THEORELL, H. et AKESON, A. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, 65, 439.
22. MORTON, R. K. — *Nature*, 1961, 192, 727.
23. MORTON, R. K. et SHEPLEY, K. — *Biochem. Z.*, 1963, 338, 122.
24. IWATSUBO, M. et DI FRANCO, A. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, 47, 891.
25. LABEYRIE, F., NASLIN, L., CURDEL, A. et WURMSER, R. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 41, 509.
26. BURTON, K. et WILSON, T. H. — *Biochem. J.*, 1953, 54, 86.
27. BOERI, E. et TOSI, L. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, 60, 463.
28. SLONIMSKI, P. P. et TYSAROWSKI, W. — *C. R. Acad. Sc.*, 1958, 246, 1111.
29. LABEYRIE, F., SLONIMSKI, P. P. et NASLIN, L. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, 34, 262.
30. IWATSUBO, M. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 77, 568.

31. MORTON, R. K. et ARMSTRONG, J. McD. — Vth Internat. Congress of Biochem., Moscow, 1961, Pergamon Press, New York, 1963, p. 213.
32. MORTON, R. K., ARMSTRONG, J. McD. et APPLEBY, C. A. — In « Haematin Enzymes », Symp., Canberra, 1959, Falk, J. E., Lemberg, R. et Morton, R. K., Edit., Pergamon Press, p. 501.
33. MORTON, R. K. et STURTEVANT, J. M. — *J. Biol. Chem.*, 1964, **239**, 1614.
34. « The problem of Cytochrome b_2 » (discussion) in « Haematin Enzymes », Symp., Canberra, 1959, Falk, J. E., Lemberg, R. et Morton, R. K., Edit., Pergamon Press, p. 567.
35. LABEYRIE, F. et SLONIMSKI, P. P. — *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1964, **46**, 1793.
36. BAUDRAS, A. — *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1965, **47**, 1177.
37. IWATSUBO, M. et DI FRANCO, A. — Article en préparation, et in [35].

Discussion générale.

1. IWATSUBO, M. et DI FRANCO, A. — *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1965, **47**, 891.
2. BEINERT, H. — In « The Enzymes », Boyer, P. D., Lardy, H. et Myrback, K. Edit., Acad. Press 1960, vol. 2, p. 339.
3. APPLEBY, C. A. et MORTON, R. K. — *Nature*, 1954, **173**, 749.
4. WEBER, G. — *Biochem. J.*, 1950, **74**, 114.
5. FRUTON, J. S. et SIMMONDS, G. — General Biochemistry, John Wiley and Sons, INC., New York, 1953, p. 294.
6. VESTLING, C. S. — *Acta Chem. Scand.*, 1955, **9**, 1600.
7. IWATSUBO, M. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, **77**, 568.
8. THEORELL, H. et NYGAARD, A. P. — *Acta Chem. Scand.*, 1954, **8**, 877.
9. THEORELL, H. et NYGAARD, A. P. — *Acta Chem. Scand.*, 1954, **8**, 1649.
10. WALAAS, O. et WALAAS, E. — *Acta Chem. Scand.*, 1956, **10**, 122.
11. NYGAARD, A. P. et THEORELL, H. — *Acta Chem. Scand.*, 1955, **9**, 1587.
12. THEORELL, H. et NYGAARD, A. P. — *Arkiv. för Chemi.*, 1954, **7**, 205.
13. IWATSUBO, M. et DI FRANCO, A. — Article en préparation.
14. FISHER, H. F. et Mc GREGOR, L. L. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **43**, 557.
15. THEORELL, H. et LANGAN, T. A. — *Acta Chem. Scand.*, 1960, **14**, 933.
16. WINER, A. D. et THEORELL, H. — *Acta Chem. Scand.*, 1960, **14**, 1729.
17. VAN EYS, J., STOLZENBACK, F. E., SHERWOOD, L. et KAPLAN, N. C. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, **27**, 63.
18. DUYSSENS, L. N. M. et KRONENBERG, G. H. M. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, **26**, 437.
19. WINER, A. D. et SCHWERT, G. W. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, **29**, 424.
20. DIXON, M. et KLEPPE, K. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, **96**, 357.
21. YAGI, K. et OZAWA, T. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **42**, 381.
22. IWATSUBO, M. et LABEYRIE, F. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, **59**, 614.
23. YAGI, K., OZAWA, T. et HARADA, M. — *Nature*, 1960, **188**, 745.
24. YAGI, K., OZAWA, T. et NAOI, M. — *J. Biochem.*, 1964, **56**, 487.
25. DER VARTANIAN, D. V. et VEEGER, C. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, **92**, 233.
26. BURTON, K. — *Biochem. J.*, 1951, **48**, 458.
27. YAGI, K. et OZAWA, T. — *Biochem. J.*, 1963, **54**, 204.
28. YAGI, K. et OZAWA, T. — *Biochem. J.*, 1964, **55**, 682.
29. YAGI, K. et OZAWA, T. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, **81**, 29.
30. LABEYRIE, F. et SLONIMSKI, P. P. — *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1964, **46**, 1793.
31. LABEYRIE, F., GROUDINSKY, O., JACQUOT-ARMAND, Y. et NASLIN, L. — *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1965.
32. MORTON, R. K. et SHEPLEY, K. — *Biochem. Z.*, 1963, **338**, 122.
33. IWATSUBO, M. et DI FRANCO, A. — Article en préparation et in (30).

DEUXIÈME THÈSE.

Propositions données par la Faculté :

Application de la résonance
paramagnétique électronique à l'étude
des semi-quinones
dans les flavoenzymes

Vu et approuvé :

Paris, le 3 Mai 1965.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY.

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE.

Achevé d'imprimer le 15 février 1966.

M. DECLUME imprimeur, Lons-le-Saunier — 21-66-250.
Février 1966 « Dépôt légal 2^e trimestre 1966 — N° 5717 ».

Printed in France.